

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

На правах рукопису

ВУС КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.352.335.152

ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ДЕТЕКТУВАННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ

03.00.02 – біофізика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Науковий керівник:
Горбенко Галина Петрівна,
доктор фізико-математичних наук,
професор

Харків – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОДІЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	16
1.1. Структура та фізичні властивості фібрилярних агрегатів білків	16
1.1.1. Біологічна роль амілоїдних фібрил.....	16
1.1.2. Будова фібрилярних агрегатів	17
1.1.3. Кінетика фібрилізації білка	20
1.1.4. Фізичні властивості амілоїдних фібрил	26
1.2. Молекулярні механізми взаємодії амілоїдних фібрил зі специфічними хром- та флуорофорами	33
1.2.1. Детектування амілоїдних фібрил за допомогою конго червоного.....	36
1.2.2. Тіофлавін Т та інші флуоресцентні маркери для амілоїдів.....	40
1.3. Амілоїдні фібрили як новий клас наноматеріалів.....	44
1.3.1. Застосування амілоїдних структур у біології та медицині.....	45
1.3.2. Амілоїдні фібрили як можливий компонент нанопристроїв.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	50
2.1. Матеріали.....	50
2.2. Об'єкти досліджень	52
2.3. Електронна мікроскопія	54
2.4. Спектри кругового дихроїзму	55
2.5. Спектроскопічні вимірювання	56
2.6. Флуоресцентні вимірювання	58
2.6.1. Розрахунки параметрів зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами	60
2.6.2. Визначення квантового виходу флуоресцентних зондів.....	63
2.6.3. Дослідження часороздільної флуоресценції зондів	64
2.6.4. Дослідження індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ)	65
2.7. Квантово-хімічні розрахунки	67

2.8. Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних.....	69
2.9. Висновки.....	69
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ НОВИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ.....	70
3.1. Визначення параметрів зв'язування за допомогою флуоресцентного титрування	70
3.1.1. Бензантронові зонди та фібрили лізоциму, отримані за умов кислотної денатурації та шейкінгу.....	70
3.1.2. Бензантронові зонди та фібрили лізоциму, отримані за умов кислотної денатурації або у концентрованому етанольному розчині	83
3.1.3. Зонди АВМ, тіофлавін Т та нільський червоний і фібрили інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації та шейкінгу	92
3.1.4. Скварайнові зонди і фібрили лізоциму та інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації.....	95
3.1.5. Похідні тіофлавіну Т і фібрили лізоциму та інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації	109
3.1.6. Розрахунки параметрів зв'язування нових зондів з фібрилами за допомогою двохсайтової моделі	113
3.2. Вивчення фізико-хімічного оточення бензантронових зондів у фібрилах лізоциму за допомогою вимірювань червоного зсуву максимуму флуоресценції та часороздільної флуоресценції	114
3.3. Детектування амілоїдних фібрил та вивчення сайтів зв'язування зондів з агрегатами білка методом індуктивно-резонансного переносу енергії	124
РОЗДІЛ 4. ДЕТЕКТУВАННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ ЗА ДОПОМОГОЮ НОВИХ ЗОНДІВ ПРИ ВАРІЮВАННІ УМОВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	136
4.1. Спектральні властивості нових флуорофорів у розчинниках з різною полярністю та в'язкістю	136
4.1.1. Бензантронові та скварайнові зонди.....	136
4.1.2. Похідні тіофлавіну Т.....	141

4.2. Вивчення впливу рН та іонної сили на чутливість бензантронів та сквараїнів до амілоїдних фібрил лізоциму F_{acs}	142
4.3. Висновки.....	154
РОЗДІЛ 5. КВАНТОВО-ХІМІЧНІ РОЗРАХУНКИ БЕНЗАНТРОНОВИХ, СКВАРАЇНОВИХ ЗОНДІВ ТА ПОХІДНИХ ТІОФЛАВІНУ Т	155
5.1. QSAR аналіз нових флуорофорів.....	156
5.2. Залежність фотофізичних властивостей похідних тіофлавіну Т від торсійних кутів між бензотіазольним та фенольним кільцями	170
5.3. Висновки.....	176
ВИСНОВКИ.....	178
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	180
ДОДАТОК А. Статистичні характеристики теоретичних моделей, отриманих методом часткової регресії найменших квадратів.....	225

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

АСМ	атомна силова мікроскопія
ТЕМ	трансмісійна електронна мікроскопія
ЕПР	електронний парамагнітний резонанс
ЯМР	ядерний магнітний резонанс
CD	круговий дихроїзм
РСА	рентгеноструктурний аналіз
ПЕТ	позитронна емісійна томографія
ФДТ	фотодинамічна терапія
Фур'є	ІЧ-Фур'є спектроскопія в інфрачервоному діапазоні
спектроскопія	
CR	конго червоний
ThT	тіофлавін Т
1,8-АНС	8-аніліно-1-нафталіно-сульфонова кислота
MHB	синій гідрольний Міхлера
NR	нільський червоний
DCVJ	9-(2,2-диціановініл)-юлолідін
R101	родамін 101
DMSO	диметилсульфоксид
DMF	диметилформамід
DCM	дихлорметан
GL	гліцерин
апо-А-I	аполіпопротеїн А-I
F_{acs} , F_{ac} , F_{eth}	амілоїдні фібрили лізоциму, отримані різними способами
Ins_{acs} , Ins_{acst} , Ins_{ac}	амілоїдні фібрили інсуліну, отримані різними способами
$A\beta$	амілоїдний β -пептид
AD	хвороба Альцгеймера
ГМТБ	гематоенцефалічний бар'єр

M3	фрагмент апо-A-I G26R/W50F_W72F
G26	фрагмент апо-A-I-G26R
M1	фрагмент апо-A-I G26R/W8F_W50F
M2	фрагмент апо-A-I G26R/W8F_W72F
A83	фрагмент апо-A-I 1-83
ІРРЕ	індуктивно-резонансний перенос енергії
Д	донор
А	акцептор
QSAR аналіз	аналіз кількісного співвідношення "структура-активність"
LE	локально збуджений стан флуорофора
TICT	закручений збуджений стан внутрішньомолекулярного переносу заряду флуорофора
Q	квантовий вихід флуоресценції зонда
K_a	константа асоціації, мкМ ⁻¹
n	стехіометрія зв'язування, моль/моль
α	коефіцієнт пропорційності між концентрацією зв'язаного зонда та різницею квантових виходів зонда у вільному та зв'язаному станах, мкМ ⁻¹
Γ_D	границя детектування (концентрація білка, за якої інтенсивність флуоресценції 0.5 мкМ зонда зростає у 2 рази), мкМ
ΔG	вільна енергія Гіббса, кДж/моль
I/I_0	відносне зростання інтенсивності флуоресценції 0.5 мкМ зонда у присутності 50 мкМ нативного або фібрилярного білка
I/I_{nat}	зростання інтенсивності флуоресценції 0.5 мкМ зонда у присутності 50 мкМ фібрилярного білка відносно його флуоресценції у присутності нативного лізоциму
I	інтенсивність флуоресценції, відн. од.
D	поглинання

ε	молярний коефіцієнт екстинкції, $M^{-1} cm^{-1}$
C	концентрація зонда, мкМ
Z	загальна концентрація флуорофора, мкМ
P	молярна концентрація білка, мкМ
ЧЗМФ	червоний зсув максимуму флуоресценції зонда, нм
$\langle \tau \rangle$	усереднений час життя молекули флуорофора, нс
ІРПЕ	індуктивно-резонансний перенос енергії
R_0	радіус Фьорстера, нм
r	відстань між донором та акцептором, нм
E	ефективність переносу енергії, %
κ^2	орієнтаційний фактор
L	довжина флуорофора, Å
E_{HOMO}	енергія вищої зайнятої орбіталі
E_{LUMO}	енергія нижчої вільної орбіталі
SA	площа поверхні флуорофора
CV	молекулярний об'єм
W	ширина молекули флуорофора, Å
H	товщина молекули флуорофора, Å
μ_g	дипольний момент основного стану зонда, Д
μ_e	дипольний момент збудженого стану зонда, Д
f	сила осцилятора
φ	двогранний кут між донором та акцептором молекули зонда
S_0	основний стан флуорофора
S_1^{abs}	перший збуджений не релаксований стан флуорофора
ΔE_e	енергія вертикального переходу $S_0 \rightarrow S_1^{abs}$, з основного до нерелаксованого найнижчого збудженого стану, сформованого одразу після поглинання фотону

ВСТУП

Актуальність теми. Медична діагностика нейродегенеративних та «конформаційних» захворювань на доклінічних стадіях, на яких відбувається формування та відкладання амілоїдних фібрил у різних органах та тканинах організму, полягає у кількісному визначенні цих високоупорядкованих агрегатів *in vivo* або *in vitro* [1,2]. Іншою проблемою, яка потребує термінового вирішення, є пошук ліків проти хвороб Альцгеймера, Паркінсона, системного амілоїдозу та ін. Механізм дії потенційних лікувальних препаратів полягає у блокуванні фібрилогенезу та зниженні токсичності пре-фібрилярних агрегатів білка, що викликають апоптоз клітин [3,4]. Поряд з цим, унікальні фізичні властивості амілоїдних фібрил є підґрунтям для створення різноманітних наноматеріалів на їх основі [5]. Зазначені вище фактори зумовили невпинне зростання в останні десятиріччя активності науковців у вивченні структурно-фізичних особливостей амілоїдних фібрил. Зокрема, було визначено роль водневих та гідрофобних зв'язків у стабілізації структури агрегатів, залежність токсичності від морфології фібрил, причини їх формування *in vivo* (генетичні мутації, оксидативний стрес, тощо) та основні дестабілізуючі фактори, що призводять до фібрилогенезу *in vitro*: екстремальні значення рН, наявність денатурантів чи солей, підвищена температура [6,7]. Однак, підвищення чутливості медичної діагностики, розробка якісних лікувальних препаратів та амілоїдних наноматеріалів із заданими фізичними властивостями потребують більш глибоких досліджень характеристик патогенних агрегатів білків, зокрема, при варіюванні факторів зовнішнього середовища. Одним із основних фізичних методів, що дає можливість провести такі дослідження на молекулярному рівні, є метод флуоресцентних зондів. У контексті флуоресцентного детектування амілоїдних фібрил найбільш широко застосовуваним є представник класу бензотіазольних барвників, тіофлавін Т. Ідентифікація патогенних білкових агрегатів за допомогою тіофлавіну Т – найпопулярніший метод медичної діагностики «конформаційних» захворювань,

оскільки зв'язування з фібрилами супроводжується зростанням квантового виходу барвника на 2–3 порядки. Однак, тіофлавіновий тест має суттєві недоліки, зокрема: псевдо-позитивний сигнал при зв'язуванні зонда з бактеріями та нативними білками; здатність впливати на кінетику фібрилізації та стабільність амілоїдних фібрил; залежність чутливості до фібрилярних агрегатів від типу білка, рН та іонної сили. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває проблема тестування нових флуоресцентних зондів з покращеними спектральними властивостями, як потенційних амілоїдних маркерів та репортерів структурно-фізичних особливостей білкових агрегатів. Серед питань, що потребують вирішення, слід зазначити: 1) визначення параметрів зв'язування флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами; 2) виявлення кореляції між структурними особливостями і фізичними властивостями амілоїдних фібрил та спектральною відповіддю потенційних амілоїдних маркерів та інгібіторів фібрилізації; 3) ідентифікація факторів, що модулюють взаємодії нових флуоресцентних зондів з патогенними білковими агрегатами, 4) встановлення залежності між специфічністю барвників до амілоїдних фібрил та їх структурою.

Серед розмаїття наявних барвників особливу увагу привертають похідні бензантронну, які характеризуються високими коефіцієнтами екстинкції, значним Стоксовим зсувом, термо- та фотостабільністю [8]. Крім того, акцепторна природа карбонільної групи бензантронів та багата електронами аміногрупа у позиції С3 зумовлюють перерозподіл заряду при збудженні зондів, а отже і чутливість до полярності і в'язкості мікрооточення [9]. З огляду на це, похідні бензантронну були застосовані у якості репортерів при вивченні в'язкості клітинних мембран, структурних змін білків та ДНК у пацієнтів з різними патологіями [10]. Інший клас сполук – сквараїнові зонди, які широко використовуються для дизайну сенсорів, біологічного мічення, у фотопровідних пристроях та у фотодинамічній терапії [11]. Ці барвники характеризуються високою фотостабільністю та вузькою полосою поглинання в

області «фототерапевтичного вікна», у якому глибина проникнення світла у тканини суттєво підвищується.

Зв'язок теми з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна у відповідності з планом науково-дослідних робіт кафедри за темами:

«Дослідження механізмів формування відгуку біологічних систем та фізичних засад нових методів медичної мікро- та макродіагностики» (№ держреєстрації 0109U001322);

«Роль іонів важких металів в мембранних ефектах амілоїдних білків» (№ держреєстрації 0113U005246) Державного фонду фундаментальних досліджень;

«Дослідження мембрано-опосередкованих механізмів токсичності пре-амілоїдних агрегатів білків» (№ держреєстрації 0112U004611) Державного фонду фундаментальних досліджень;

«Білок-ліпідні взаємодії як детермінант амілоїдогенних властивостей білків» (№ держреєстрації 0111U008000) Державного фонду фундаментальних досліджень.

Мета і задачі дослідження. Мета даної роботи полягала у встановленні фізичних механізмів взаємодії нових потенційних флуоресцентних амілоїдних маркерів бензантронового, сквараїнового та бензотіазольного класів з амілоїдними фібрилами різної морфології. Для досягнення цієї мети були поставлені та вирішені наступні задачі:

- за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії отримати ізотерми зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами ряду білків, утворених *in vitro* при варіюванні зовнішніх умов; визначити параметри зв'язування барвників з білковими агрегатами; оцінити чутливість нових флуорофорів до змін морфології амілоїдних фібрил;
- охарактеризувати спектральну поведінку нових флуоресцентних зондів за умов варіювання полярності та в'язкості їх мікрооточення, а також встановити залежність чутливості барвників до амілоїдних фібрил від рН та іонної сили розчину;

- з використанням часороздільної флуоресцентної спектроскопії визначити час життя бензантронових зондів в амілоїдних фібрилах лізоциму;
- за допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії оцінити локалізацію зондів, зв'язаних з амілоїдними фібрилами;
- на основі квантово-хімічних розрахунків та кореляційного аналізу виявити фактори, що впливають на константу асоціації, квантовий вихід та інші фотофізичні властивості флуорофорів у присутності патогенних білкових агрегатів та при варіюванні фізико-хімічних характеристик середовища;
- відібрати флуорофори, котрі можуть бути використані у якості амілоїдних маркерів з покращеними спектральними властивостями, порівняно з тіофлавіном Т.

Об'єкт дослідження – модельні системи, що склались із нових флуоресцентних зондів бензантронового, скварайнового або бензотіазольного ряду, та амілоїдних фібрил лізоциму, інсуліну або аполіпопротеїну А-I (сформованих *in vitro*).

Предмет дослідження – процес взаємодії нових потенційних флуоресцентних амілоїдних маркерів з фібрилярними агрегатами білків.

Методи дослідження – флуоресцентна спектроскопія, спектрофотометрія, часороздільна флуоресцентна спектроскопія, електронна мікроскопія, спектроскопія кругового дихроїзму, квантово-хімічні розрахунки, комп'ютерне моделювання. Для обробки експериментальних даних використовували нелінійну оптимізацію та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів

- За допомогою методів флуоресцентної спектроскопії вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами, утвореними *in vitro*. В рамках моносайтової моделі зв'язування проведено оцінку термодинамічних параметрів процесу асоціації досліджуваних флуорофорів з патогенними білковими агрегатами. Аналіз чутливості зондів до амілоїдних фібрил дозволив

виявити найбільш перспективні потенційні амілоїдні маркери: G6, G7, ІАН, АВМ, АМ4, ІВН, АМ12, А4, 3АМ39, АМ15, АМ2-23, АМ18-23. Специфічність G6, G7 та низки бензантронів до фібрил лізоциму певної морфології виявилася вищою, ніж Тіофлавіну Т. G6, G7 та АМ2, АМ3 показали найбільшу чутливість до морфології амілоїдних фібрил.

- З використанням методу часороздільної флуоресцентної спектроскопії вперше визначено часи життя нових бензантронів флуоресцентних зондів, зв'язаних з амілоїдними фібрилами лізоциму.
- На основі аналізу червоного зсуву максимумів флуоресценції, змін спектроскопічних характеристик флуорофорів при варіюванні в'язкості та полярності середовища, даних часороздільної флуоресцентної спектроскопії та квантово-хімічних розрахунків, продемонстровано, що нові сквараїнові зонди – G6, G7, похідні тіофлавіну Т – ІСТ2, ІСТ3 – найбільш чутливі до в'язкості, а бензантронів зонди – до полярності мікрооточення.
- За допомогою методу індуктивно-резонансного переносу енергії вперше запропоновано модель локалізації бензантронів зондів у жолобках бета-складчатого остову амілоїдних фібрил.
- На основі квантово-хімічних розрахунків та QSAR аналізу вперше встановлено позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил найкращих амілоїдних маркерів бензантронів ряду та такими молекулярними дескрипторами, як ліпофільність, ширина молекули зонда, і сума зарядів на атомах азоту.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи створюють підґрунтя для більш детального розуміння молекулярних механізмів взаємодії флуоресцентних зондів різних класів з амілоїдними фібрилами білків *in vitro* та *in vivo*. Отримані значення параметрів зв'язування флуорофорів з патогенними білковими агрегатами та квантового виходу флуоресценції, поряд з даними стосовно високої чутливості зондів до фізико-хімічних параметрів оточення, дозволяють не тільки детектувати амілоїдні структури, але і

диференціювати їх по морфології при використанні нових барвників у медичній діагностиці. Висновки стосовно впливу дескрипторів ліпофільності, ширини бензантронових зондів і суми зарядів на атомах азоту на чутливість цих сполук до амілоїдних фібрил можуть бути корисними при синтезі нових флуоресцентних маркерів з покращеними спектральними властивостями, або ж інших органічних молекул, здатних інгібувати формування токсичних агрегатів білка шляхом високоспецифічної асоціації з амілоїдними інтермедіатами. Нові бензантронові та сквараїнові зонди зарекомендували себе як флуорофори, фотофізичні характеристики яких є високочутливими до морфології фібрилярних агрегатів, утворених різними білками та/або певним білком при варіюванні зовнішніх умов. Результати аналізу спектральних характеристик бензантронових, сквараїнових зондів та похідних тіофлавіну Т, зв'язаних з амілоїдними фібрилами, можуть бути використані при розробці ліків проти «конформаційних» захворювань. Окрім цього, отримані результати можуть бути корисними з точки зору нанотехнологічних застосувань амілоїдів, наприклад, при створенні флуоресцентних амілоїдних наноплівочок, що випромінюють поляризоване світло.

Особистий внесок здобувача. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає: у роботах [14,15,19,25] – участь в отриманні та інтерпретації експериментальних даних, обговоренні результатів, написанні статей та тез; у роботах [13,16-18] – отримання експериментальних даних, їх інтерпретація та написання статей; у роботах [12,34] – проведення експериментів, квантово-хімічних розрахунків, написання статей та тез; у роботах [20-24,26,27-33,35] – отримання та інтерпретація експериментальних даних, написання тез доповідей.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та доповідались на: VII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 2011; VIII-th European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, 2011; VI міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, 2011; 19

международной школе-конференции «Математика. Компьютер. Образование», Пушкино, Россия; VIII міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії «БФФХ – 2012», Севастополь, 2012; XVI международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, Россия, 2012; IV Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы химии и биологии», Пушкино, Россия, 2012; International conference «Development and application of new fluorescent materials and methods», Daugavpils, Latvia, 2012; IV Съезде биофизиков России «Физико-химические основы функционирования биополимеров», Новгород, Россия), 2012; X міжнародній міждисциплінарній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна – 2013: Науки про життя», Київ, 2013; Міжнародній науково-практичній конференції «Нанотехнології та наноматеріали (NANO-2013), Буковель, 2013; 13-th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF-13), Genoa, Italy, 2013; IV международной конференции молодых ученых “Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2014», Пушкино, Россия, 2014; III міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», Донецьк, 2014; Науково-технічній конференції «Люмінесцентні процеси у конденсованих середовищах», Харків, 2015; Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2015». – Пушкино, Россия, 2015.

Публікації. Основні матеріали дисертації опубліковані у 24 наукових працях, у тому числі в 8 статтях у наукових фахових журналах та в 16 тезах доповідей на міжнародних і національних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, п'яти основних розділів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 227 сторінок (без урахування списку використаних джерел, додатків, рисунків і таблиць, що займають повну сторінку – 158 сторінок).

Дисертація містить 73 рисунки, 31 таблицю. Список використаних джерел (404 найменування) займає 44 сторінки; додаток – 3 сторінки; таблиці та рисунки, що займають повну сторінку – 23 сторінки.

РОЗДІЛ 1

ВЗАЄМОДІЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Структура та фізичні властивості фібрилярних агрегатів білків

1.1.1. Біологічна роль амілоїдних фібрил

Для діагностики та пошуку ліків проти хвороб Альцгеймера, Паркінсона, діабету II типу та інших патологій, розвиток яких супроводжується утворенням нерозчинних ниткоподібних агрегатів білків (амілоїдних фібрил), науковці зосередили свої зусилля на вивченні їх структури та властивостей [36-38]. У здорової людини клітини протидіють утворенню фібрил на стадії синтезу білка (за допомогою шаперонів, а також протеаз, оскільки частково згорнуті конформації поліпептиду є ключовими інтермедіатами для утворення нативної структури або фібрилізації внаслідок неправильного згортання) [39]. Однак, за несприятливих умов захисні системи організму можуть виявитися перезавантаженими, що призводить до неконтрольованого формування фібрил. Однією з найбільш загальних причин неправильного згортання (місфолдингу) білкових молекул *in vivo* (або денатурації *in vitro*), з їх подальшою агрегацією, є дестабілізація структури поліпептидного ланцюга. *In vivo* вона може бути викликана мутаціями; оксидативним стресом (зокрема, підвищенням рівня Ca^{2+} та інших модифікаторів мембранного потенціалу усередині клітини); хімічними модифікаціями; зараженням (лише для фібрил пріонного білка, якщо вони потрапили у шлунок) [40,41]. *In vitro* до дестабілізації структури білка призводять фактори зовнішнього середовища, що викликають експонування гідрофобних областей білка, руйнування внутрішньомолекулярних водневих зв'язків та посилення гідратації. До числа таких факторів відносяться екстремальні значення рН, наявність солей, що екранують заряд білка, висока температура, денатуранти, органічні розчинники (етанол, сечовина або гуанідингідрохлорид) [7,42-44]. Цікаво, що окрім здатності викликати низку так

званих конформаційних патологій, амілоїдні фібрили здатні виконувати функції, необхідні організму, – наприклад, вони включаються в імунну систему організму, беруть участь у синтезі меланіну людини, або входять до складу біоплівки бактерій [39,45,46].

1.1.2. Будова фібрилярних агрегатів

Незважаючи на те, що амілоїдогенні пептиди та білки мають різні амінокислотні послідовності та структуру, усі вони здатні утворювати нерозчинні, насичені β -ланцюгами фібрилярні агрегати. Цю загальну тенденцію можна пояснити стабілізацією зрілих фібрил внутрішньо- та міжмолекулярними водневими зв'язками між амідними групами пептидного остову та карбонілами (рис. 1.1, ліворуч) [47,48]. Стабілізація фібрил також відбувається завдяки гідрофобним та електростатичним взаємодіям [5,49]. На відміну від нативного білка, у фібрилах переважають міжмолекулярні, а не внутрішньомолекулярні зв'язки [50].

Зрілі фібрили – це високопорядковані ниткоподібні нерозгалужені агрегати з центральною крос-бета структурою (у якій центральні протофіламенти перпендикулярні до осі фібрили, а певні фрагменти поліпептидних ланцюгів мономерів утворюють β -листи, або ядро фібрили) діаметром 6 – 20 нм та довжиною близько декількох мікрометрів, що складаються із закручених один відносно одного, асоційованих за допомогою гідрофобних зв'язків 2 – 6 протофіламентів діаметром 2 – 5 нм (рис. 1.1, праворуч) [39]. Кожен протофіламент утворюється декількома β -листами мономерів, β -ланцюги яких паралельні один до одного (рис. 1.2). Взаємне закручення сприяє оптимізації водневих та електростатичних взаємодій, а також стекінгу бокових залишків амінокислот, тому до складу фібрил входять саме закручені протофіламенти [51]. В цілому, такі чинники, як гідрофобний ефект, ентропійні фактори та хіральність ініціюють взаємне закручення протофіламентів [52]. Фібрили, що складаються з декількох β -листів, в основному, мають протофіламенти, закручені ліворуч, причому ступінь

закручення залежить від іонної сили, як показано, зокрема, для фібрил β -лактаглобуліну [53]. Слід зауважити, що латеральне впорядкування

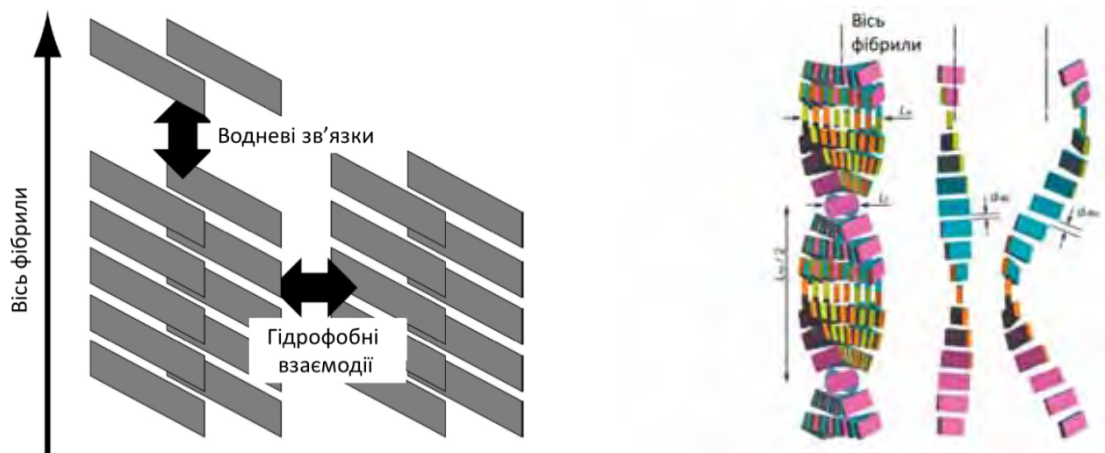


Рисунок 1.1. Асоціація β -листів (гідрофобні взаємодії) та β -ланцюгів (водневі зв'язки) в амілоїдній фібрилі. Відстань між β -листами ~ 11 Å, між β -ланцюгами ~ 4.8 Å (ліворуч). Схематичне зображення амілоїдної фібрили, що складається з 4 β -ланцюгів. Довжина напівперіоду спіралі ($L_{hp}/2$, ~ 6 – 12 нм), ширина фібрили (L_w), її товщина (L_t) показані на рисунку. Центральний та боковий протофіламенти мають довжини міжмолекулярних водневих зв'язків d_{HBi} та d_{HB0} (~ 4.8 Å), відповідно. Довжина регулярної порожнини (жолобка) фібрили ~ 8 – 9 Å (праворуч). Взято з [51]

рідкокристалічного характеру ($\sim L^2D$, де L та D – довжина та діаметр протофіламента) виникає між довгими протофіламентами (~ 0.5 – 1 μ M) [52]. Ці взаємодії розповсюджуються на відстань, що на декілька порядків перевищує відстань між протофіламентами. Подальша агрегація протофіламентів відбувається за відсутності екранування електростатичного відштовхування, за допомогою гідрофобних сил. Агреговані протофіламенти закручуються один відносно одного, формуючи фібрилу типу «закручена стрічка» (рис. 1.2, ліворуч), при цьому крок закручення лінійно пропорційний до числа протофіламентів. На контурну довжину фібрил впливають: інтенсивність перемішування під час інкубації білка, наявність у розчині зарядженого полімеру, ультразвук, тощо [52].

Важливо зазначити, що фрагменти молекули білка, здатні до формування ядра амілоїдних фібрил можна теоретично передбачити. Ядро фібрили, як

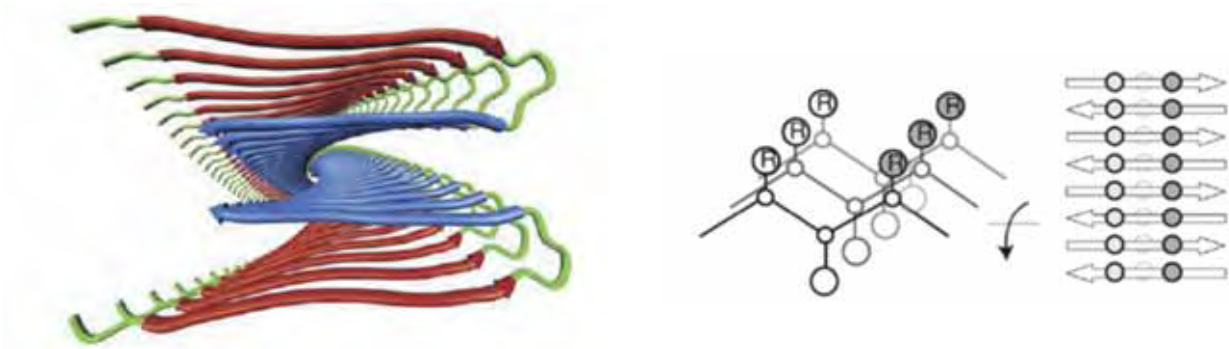


Рисунок 1.2. Схематичне зображення двох β -листів протофіламента амілоїдної фібрили, що складаються з асоційованих β -ланцюгів мономерів, закручених один відносно одного. Вид згори уздовж напрямку осі фібрили (ліворуч). Схематичне зображення крос-бета структури асоційованих β -ланцюгів фібрили (праворуч – вид згори у напрямку, паралельному головній осі фібрили, посередині – один β -лист). R – амінокислотні залишки. Взято з [54]

правило, формується структурованим фрагментом амінокислотної послідовності частково денатурованого білка, хоча для коротких пептидів – невпорядкованими ділянками [50]. Гідрофобні, ароматичні амінокислотні залишки сприяють агрегації, бо гідрофобні взаємодії є ключовим її фактором, як показано, зокрема, методами молекулярного моделювання [50]. Крім того, послідовності амінокислот з високим значенням щільності пакування (параметр, що дорівнює середньому числу залишків, що можуть знаходитися на певній відстані від даної амінокислоти), теж сприяють агрегації, що свідчить про важливу роль стеричних взаємодій (дійсно, два β -листи формують структуру «стеричної блискавки», з високою щільністю пакування внутрішніх гідрофобних поверхонь) [55]. Одним з теоретичних методів для прогнозування агрегаційної здатності амінокислотних залишків є Zyggregator [56]. У цьому алгоритмі амілоїдогенність кожної амінокислоти залежить від її властивості формувати α -спіраль, β -структуру, а також від гідрофобності та заряду. Здатність формувати β -структуру та гідрофобність (ароматичність) амінокислоти підвищують її амілоїдогенність, а решта факторів – навпаки, знижують (як показано для $A\beta(1-42)$, α -синуклеїну, тау-F та інших білків) [57]. Цікаво, що послідовність амінокислотних залишків, що входять до складу ядра

фібрили, часто формує амфipатичні α -спіралі. Це характерно, наприклад, для аполіпопротеїну А-I людини, що має амфipатичну спіраль, де позитивно заряджені залишки знаходяться на межі полярної та неполярної областей, а негативно заряджені – у центрі полярної області [58]. Лізоцим також має амфipатичну спіраль, на одному боці якої розташовані гідрофобні, а на іншому – полярні та заряджені амінокислотні залишки [59]. Амфipатичність білків сприяє їх агрегації у ліпідному оточенні.

1.1.3. Кінетика фібрилізації білка

Кінетика амілоїдоутворення залежить від амінокислотної послідовності білка, а також від умов формування фібрил, що визначають природу та ступінь білок-білкових взаємодій у процесі фібрилізації в цілому.



Рисунок 1.3. Енергетична діаграма згортання білка. Її профіль показує перехід від нативного стану з внутрішньомолекулярними взаємодіями, що домінують, до фібрилярної структури (більш глибока енергетична воронка), де переважають міжмоллекулярні взаємодії. Взято з [60]

На рис. 1.3 показано енергетичні стани різних форм білка. Видно, що нативний стан відповідає локальному мінімуму енергії, а фібрилярний – глобальному [50,60]. Згідно з моделлю «нуклеації-полімеризації», на першому етапі фібрилізації за певний час, що називається «лаг-періодом», утворюється «ядро» фібрили (декілька асоційованих β -ланцюгів). Формування ядра є найдовшою стадією і проходить лише за певної критичної концентрації білка (для кожної температури існує своя рівноважна концентрація мономерів, перевищення якої призводить до метастабільного стану

супернасичення системи \rightarrow нуклеація стає можливою; після завершення формування агрегатів білка концентрація мономерів, що залишилися у розчині,

не перевищує цієї критичної концентрації), а після її закінчення до ядра приєднуються інші мономер, і фібрила росте швидко [61].

Для описання кінетики фібрилізації запропоновано багато моделей [62], що описують залежність типів нуклеації [63,64] та елонгації [65,66] від температури, концентрації, фрагментацію пре-фібрилярних структур та ін. Для прикладу наведемо модель Фінке-Ватцкі, що дозволяє знайти константи нуклеації та росту фібрил [67]:

$$-\frac{dC}{dt} = k_1 C + k_2 C(C_0 - C), \quad (1.1)$$

де k_1 та k_2 – константи нуклеації та росту, відповідно; C_0 та C – початкова концентрація нативного білка та його концентрація у певний момент часу, відповідно; $C_0 - C$ – концентрація агрегатів білка у даний момент часу.

Цікаво, що 100% фібрилізація білка неможлива через існування загальних умов рівноваги фаз. Це також підтверджується вимірюванням концентрації мономерів після завершення етапу фібрилізації [66,68]. Наприклад, з 25 мкМ нативного А β -пептиду отримано (рН 7.4, 37 °С) лише 1 мкМ фібрил [67]. Звісно, це залежить від умов формування фібрил: наприклад, ступінь агрегації фрагменту β A4 був вищий у присутності іонів Fe³⁺, у порівнянні з іонами Al³⁺ [69]. Окрім цього, виявлено залежність і від наявності мутацій: наприклад, за однакових умов із лізоциму SAM W62G утворилось більше амілоїдних фібрил, ніж із лізоциму SAM без мутацій [70].

Моделі кристалізації білка та фібрилізації у деякій мірі подібні [67]. Обидві вони включають термодинамічну рівновагу між фазами, початкову асоціацію молекул з утворенням стабільного ядра, та формування супрамолекулярних структур шляхом об'єднання елементів росту. На основі принципів росту кристалів, Р. Креспо зі співавторами виділили наступні детермінанти росту фібрил [66,71]. *Термодинамічна сила* росту фібрил – зміна хімічного потенціалу $\Delta\mu$, що має місце при певній температурі та концентрації білка у розчині:

$$\Delta\mu = kT \ln \frac{a}{a^*}, \quad (1.2)$$

де a та a^* – активності супернасичених та насичених розчинів білка, відповідно, k – константа Больцмана. На практиці знаходять приблизні значення перенасичення σ як функцію концентрації C та розчинності білка C^* :

$$\sigma = \frac{C - C^*}{C^*} \quad (1.3)$$

Розчинність білка відповідає концентрації розчиненого білка, що врівноважує хімічний потенціал фібрилярної фази. C^* не залежить від початкової концентрації білка, її можна отримати вимірюванням концентрації після достатньо довгого періоду інкубації. З урахуванням $\alpha = \Delta m / \Delta m_T$ (відношення приросту маси фібрил за даний проміжок часу до загальної маси фібрил, сформованих наприкінці інкубації білка) та формули (1.3) отримуємо:

$$\sigma = \frac{C_0 - C^* - (C_0 - C)}{C^*} = \frac{\Delta m_T}{VC^*} (1 - \alpha) = \sigma_0 (1 - \alpha), \quad (1.4)$$

де C_0 – масова концентрація білка, V – об'єм розчину.

Фаза нуклеації – включає конформаційні зміни нативної структури білка та формування поліморфних агрегатів (олігомерів). Досягання ядром критичного розміру n^* – найповільніший етап:

$$n^* = \frac{V}{\Delta\mu^2} + 1, \quad (1.5)$$

де V – константа, що враховує розміри та міжфазні енергії нанофібрилярних структур. Для відношення $C/C^* \gg 10$ рівноважна концентрація ядер лінійно зростає разом із C , а тому швидкість нуклеації можна розрахувати як:

$$J \cong A\sigma^2, \quad (1.6)$$

де A – кінетичний фактор.

Фаза росту (елонгації) – протягом цієї фази попередники фібрил ростуть шляхом послідовного додавання нових структурних одиниць. Цей етап більш вигідний порівняно з нуклеацією з термодинамічної точки зору (через наявність префібрилярних агрегатів), отже хоча нуклеація і елонгація деякий час проходять разом, елонгація швидко стає домінуючим етапом [72]. Швидкість елонгації G пропорційна швидкості другого процесу нуклеації, що проходить на поверхні фібрилярних агрегатів, тобто частоті, з якою молекула білка покидає рідку фазу та приєднується до поверхні фібрили [73,74]. За аналогією росту кристалу у розчині, вірогідність приєднання мономеру прямо пропорційна до: а) супернасичення σ , що регулює дифузію молекул до межі розділу фаз; б) числа енергетично вигідних станів для інтеграції (це число пропорційне до розміру кристала під час кристалізації, а у випадку фібрилярних агрегатів – до довжини L амілоїдної фібрили, або до числа β -листів у твердій фазі) [75]. Р. Креспо зі співавторами виходили з неактивного механізму зв'язування, де за латеральним приєднанням мономерів слідує їх послідовне вбудовування на кінцях фібрил [76,77]. Враховуючи також оберненість процесу поверхневої адсорбції і те, що за ним проходить швидкий (у випадку зв'язування мономерів з активними сайтами фібрили, що росте) процес дифузії, отримано рівняння для швидкості елонгації:

$$G = \frac{dL}{dt} = k_g \sigma L, \quad (1.7)$$

де k_g – константа швидкості росту, що описує приток мономерів, які зазнали конформаційних змін після приєднання до кінців амілоїдної фібрили. Маса фібрили зростає пропорційно до L . Таким чином, залежністю росту фібрил від їх розмірів (швидкість росту лінійно зростає з довжиною та масою фібрили), можна пояснити автокаталітичну природу агрегації білка [78,79].

Швидкість зростання маси m фібрилярних агрегатів з часом дорівнює:

$$\frac{dm}{dt} = a_\rho \sum_{i=0}^{\infty} \frac{dn_i}{dt} L_i + a_\rho \sum_{i=0}^{\infty} \frac{dL_i}{dt} n_i, \quad (1.8)$$

де a_ρ – площа поперечного перерізу, помножена на масову густину амілоїдних фібрил, n_i – число фібрил характерного розміру L_i . Це рівняння отримано з урахуванням виразу для маси фібрил $m = m_0 + \Delta m = a_\rho \sum_{i=0}^{\infty} n_i L_i$, де m_0 – маса «зерен». Перший член рівняння (1.8) описує формування нових ядер фібрили, що складаються з n^* молекул (рівняння (1.5)), причому нуклеація проходить зі швидкістю J (рівняння (1.6)). Другий член відповідає за елонгацію фібрил (рівняння (1.7)). Отримане рівняння не враховує вплив фрагментації фібрил на кінетику їх формування. Перепишемо формулу (1.8) у вигляді функції кінетики нуклеації та росту:

$$\frac{dm}{dt} = A\sigma^2 V n^* \frac{M_r}{N_A} + k_g \sigma \sum_{i=0}^{\infty} a_\rho n_i L_i, \quad (1.9)$$

де M_r – молекулярна маса амілоїдного білка, N_A – число Авогадро. Сума у рівнянні (1.9) відповідає масі m (рівняння 1.8). Якщо виразити Δm та σ через функцію ступеня формування амілоїдних фібрил α , отримаємо:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a(1-\alpha)[k_b(1-\alpha) + \alpha + \alpha_0], \quad (1.10)$$

де константа $k_a = k_g \sigma_0$ (швидкість фази росту); $k_b = \frac{A\bar{n}^* M_r}{N_A C^* k_g}$ (відношення швидкості фази нуклеації до фази росту); середнє значення \bar{n}^* розраховують для числа молекул у ядрі фібрили (його значення залежить від початкового супернасичення σ_0). Аналітичний розв'язок рівняння (1.10) має вигляд:

$$\alpha = 1 - \frac{1}{\frac{k_b + \alpha_0}{1 + \alpha_0} [\exp[k_a t(1 + \alpha_0)] - 1] + 1} \quad (1.11)$$

Для кінетики росту за відсутності «зерен» ($\alpha_0 = 0$) маємо спрощене рівняння:

$$\alpha = 1 - \frac{1}{k_b [\exp[k_a t] - 1] + 1} \quad (1.12)$$

Подальший аналіз виразу (1.12) показує, що значення параметру k_b дуже чутливі до точності кінетичних вимірювань. Також при високій концентрації білка з'являються багато фібрил, що призводить до зниження швидкості росту параметра $k_a \sim \sigma_0$ у порівнянні з розбавленими розчинами. Слід зауважити, що у випадку, коли роль фази нуклеації несуттєва, то параметр k_b зростає, а параметр $\nu_{50} t_{50} = 0.25(k_b + 1) \ln(1/k_b + 1)$ (величина, що складається із добутку параметрів ν_{50} та t_{50} ; t_{50} – час, необхідний для досягнення 50% росту фібрил, ν_{50} – швидкість агрегації у цей момент часу) знижується. Внаслідок цих змін лаг-період скорочується до повного зникання та набуття сигмоїдною кривою росту фібрил гіперболічної форми (при $k_b > 0.5$). На основі моделі росту фібрил її автори також запропонували 3 механізми зниження ступеня агрегації за наявності інгібітора: а) зростання розчинності білка C^* , що знижує термодинамічну силу агрегації; б) зниження швидкості нуклеації (низьке

значення відношення «нуклеація/ріст», k_b); в) блокування елонгації фібрил (зниження кінетичної константи швидкості росту, k_a).

1.1.4. Фізичні властивості амілоїдних фібрил

Механічні властивості. Амілоїдні фібрили мають унікальні фізичні властивості, зокрема, жорсткість на 3 порядки вищу, ніж біологічні мембрани, завдяки високій щільності водневих зв'язків між β -ланцюгами та щільному пакуванню бокових залишків у «стеричну блискавку» [80,81]. Також вони міцніші за філаменти актину (1.8 ГПа), мікротрубки (600 МПа), проміжні філаменти (6.4 МПа), тобто мають корисні властивості матеріалів. Модулі еластичності амілоїдних фібрил подібні до колагенових фібрил ($\sim 1 - 5$ ГПа), та досить високі як для нековалентних матеріалів. Важливою характеристикою амілоїдних фібрил є їх пластичність. Пластична деформація – властивість матеріалу існувати у багатьох метастабільних станах, що переходять один в один в результаті змін локального пакування, без дисоціації зв'язків [5]. Амілоїдні фібрили можуть змінювати морфологію шляхом одиничних мутацій, і ця здатність схожа з пластичністю монокристалічних полімерів, але не спостерігається у нативних білків. Поліморфізм фібрил і кристалів характеризується здатністю утворювати агрегати різної довжини, товщини, тощо (або енергетично різні модифікації кристалів) з однакових мономерних блоків. Нарешті, для амілоїдних фібрил та синтетичних пластичних матеріалів характерні конденсовані стани, в яких окремі молекули зв'язуються одна з одною за допомогою нековалентних взаємодій. Типові для фізичних матеріалів механічні характеристики амілоїдних фібрил, отриманих методом атомної силової мікроскопії, наведені у таблиці 1.1 [82]. Механічні властивості амілоїдних фібрил зумовлюють їх широке використання для розробки наноматеріалів.

Для коротких амілоїдних фібрил (з довжиною, нижчою за персистентну), параметр *ефективної жорсткості згинання* (за наявності деформацій зсуву) описується механічною теорією континууму:

Таблиця 1.1

Механічні властивості амілоїдних фібрил A β (1-40). Узято з [82]

Властивість	Одиниця вимірювання	Значення
Площа поперечного перерізу	A(м ²)	1,34*10 ⁻¹⁷
Другий момент інерції	I(м ⁴)	2,52*10 ⁻³⁵
Модуль Юнга	E(ГПа)	9,9/10
Модуль зсуву	G(ГПа)	10,2/5,6
Жорсткість згинання	EI(Н*м ²)	2,41*10 ⁻²⁵
Персистентна довжина	ξ	60 мкм/0,5 – 100 мкм

$$k_{eff} f(L) = \frac{P}{\delta_{ip}} = \left(\frac{L}{D_t} + \frac{L^3}{3D_b} \right)^{-1}, \quad (1.13)$$

де D_b – жорсткість згинання, D_t – жорсткість зсуву, δ_{ip} – положення кінця кантілевера (дослідження проводяться за допомогою атомної силової мікроскопії), P – латеральне навантаження амілоїдної фібрили, L – довжина амілоїдної фібрили. За відсутності деформацій зсуву:

$$\delta_{ip}^* = \frac{PL^3}{3D_b}, \text{ та } k_{eff}^* = \frac{3D_b}{L^3} \quad (1.14)$$

Відношення параметрів ефективної жорсткості згинання:

$$s = \frac{3D_b}{L^2 D_t} \quad (1.15)$$

Якщо $s < 1$, «чисте» згинання не може повністю описати поведінку фібрили, а за протилежних умов – може. *Персистентна довжина* l_p – це довжина, вище якої термічні флуктуації можуть зігнути стрижнеподібний полімер; тому вона визначає еластичні властивості фібрил.

$$l_p = EI / k_B T, \quad (1.16)$$

де E – модуль Юнга полімера, I – площинний момент інерції поперечного перерізу полімера, k_B – постійна Больцмана, T – температура. Для багатолистової амілоїдної фібрили момент інерції залежить від геометрії пакування філаментів (щільного або стрічкоподібного у випадку спіральної фібрили). Тип пакування філаментів залежить від балансу гідрофобних (притягування) та електростатичних (відштовхування) взаємодій. Для щільного типу пакування $l_p = n^2 EA_0^2 / k_B T$, для стрічкоподібного – $l_p = nr_0^4 E / k_B T$, де n – число протофіламентів, A_0 – площа одного протофіламента, r_0 – радіус протофіламента. На основі значень персистентної довжини розраховують інші параметри:

$$C_B = k_B T l_p, \quad (1.17)$$

де C_B – модуль згинання (або жорсткість згинання).

$$Y = k_B T l_p / I, \quad (1.18)$$

модуль Юнга, що характеризує механічний опір стисканню або розтягуванню фібрили (знаходиться як відношення напруги до деформації), $I \approx \pi r^4 / 4$ для протофібрили радіусу r [83]. Три механічні параметри для різних матеріалів наведені у таблиці 1.2.

Механічні властивості амілоїдних фібрил (як показано, наприклад, для β -лактаглобуліну [84]) залежать від періоду спіралі, довжини та товщини, а також від аксіального чи радіального напрямку вимірювання. Поліморфізм амілоїдних фібрил призводить до варіювання значень модуля еластичності та моменту інерції фібрилярних агрегатів. Наприклад, найбільше значення модуля еластичності спостерігалось у амілоїдних фібрил з коротких пептидів (дифенілаланін, 2 амінокислотні залишки), фрагменту пріонного білка (7 амінокислотних залишків), а низькі значення – у довгих фібрилярних структур: α -лактаглобулін, β -лактальбумін [81]. На рис. 1.4 наведено механічні

Таблиця 1.2

Персистентна довжина l_p , жорсткість згинання C_B та модуль Юнга Y різних систем. Взято з [83]

Система	l_p , нм	C_B , Н*м ²	Y , Па
Протофібрили α -лактальбуміну	-	$1,4 \cdot 10^{-28}$	$1,4 \cdot 10^8$
Фібрили інсуліну	42 ± 30	$(1,7 \pm 1,2) \cdot 10^{-25}$	$(6,3 \pm 4,5) \cdot 10^9$
ДНК	52 ± 2	-	$2,9 \cdot 10^8$
Колаген, одна фібрила	-	-	$1 - 5 \cdot 10^9$
Мікротрубка	$(1 - 8) \cdot 10^6$	-	10^8
Кісткова тканина	-	-	10^{10}
Каучук	-	-	10^7

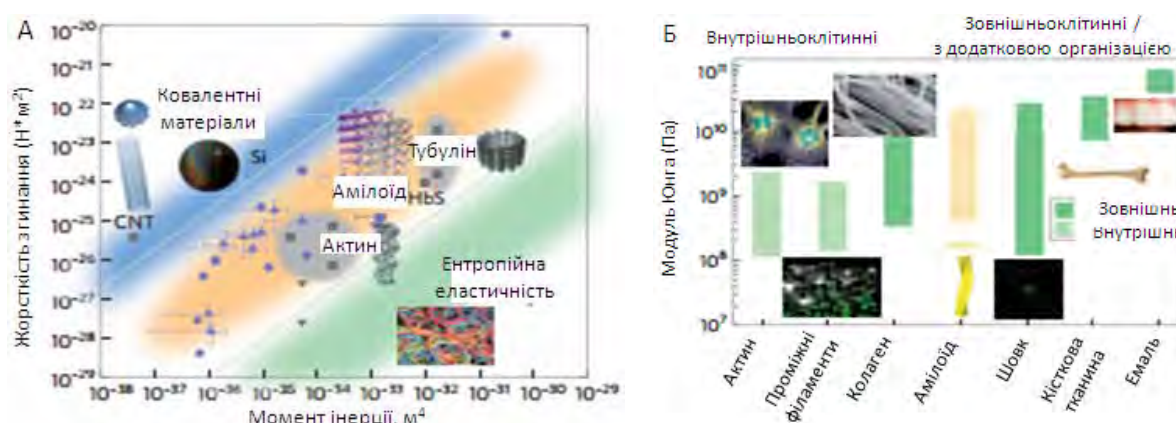


Рисунок 1.4. Механічні властивості амілоїдних фібрил у порівнянні з біологічними та неорганічними матеріалами. Взято з [81]. Залежність жорсткості згинання від моменту інерції для ковалентних матеріалів (блакитна область); тих, що мають сильні нековалентні взаємодії (наприклад, водневі зв'язки, жовта область); тих, що мають слабкі нековалентні взаємодії (зелена область). Блакитні точки – амілоїдні фібрили, сірі – інші матеріали; сірі перевернуті трикутники відповідають властивості, виміряній у напрямку, перпендикулярному до осі фібрили; трикутники показують одно- та двофіламентні форми інсуліну, його В-ланцюга, яєчного лізоциму, бета-лактоглобуліну, А β -пептиду (1-42), фрагменту GNNQQNY пріонного білка дріжджів, залишків транстиретину 105-115 (А). Варіювання величини E для декількох різних класів біологічних матеріалів усередині клітини та зовні. Найжорсткіші матеріали (колаген, кісткова тканина, емаль та шовк) локалізуються поза клітиною (Б)

властивості амілоїдних фібрил у порівнянні з іншими матеріалами.

При вивченні механічних властивостей амілоїдних фібрил застосовуються дві основних модифікації методу атомної силової мікроскопії: силова спектроскопія (механічні операції з використанням АСМ) та статистичний аналіз флуктуацій форми (аналіз фотографій АСМ без використання механічної сили) [85]. Метод АСМ пікової сили успішно використовували для вивчення механічних властивостей амілоїдних фібрил α -синуклеїну, A β (1 – 42), тау білка, інсуліну, лізоциму, та ін. [86]. У таблиці 1.3 наведено порівняльні механічні характеристики фібрил інсуліну та інших

Таблиця 1.3

Механічні властивості фібрил інсуліну. Взято з [85]

Властивість	Силова спектроскопія	Аналіз флуктуацій	Каучук	Шовк	Сталь
<i>Границя міцності, ГПа</i>	0,6 \pm 0,4	-	0,02 – 0,04	1 – 1,5	0,6 – 1,8
<i>Компенсована сила, ГПа</i>	0,4 \pm 0,3	-	0,002 – 0,004	0,8 – 1,2	0,1 – 0,2
Модуль Юнга, ГПа	3,3 \pm 0,4	6,3 \pm 4,5	10 ⁻³ – 10 ⁻²	1 – 10	200
Персистентна довжина, мкм	22 \pm 3	42 \pm 30	-	-	-
Жорсткість згинання, Н*м ²	9,1 \pm 1*10 ⁻²⁶	1,7 \pm 1,2*10 ⁻²⁶	-	-	-
Модуль зсуву, ГПа	0,28 \pm 0,2	0,13 \pm 0,01	-	-	-
Жорсткість закручення, Н*м ²	1,6 \pm 1,1*10 ⁻²⁶	0,8 \pm 0,06*10 ⁻²⁶	-	-	-

матеріалів, отриманих двома різними методами. Сила амілоїдних фібрил визначається першим методом при розрахунках максимальних значень тензору напруги:

$$\sigma_{xx} = Ez\zeta''(x), \quad (1.19)$$

де z – відстань від нейтральної осі (положення по вертикальній осі, коли фібрила та наконечник кантилевера тільки торкаються одне одного), $\zeta(x)$ описує форму фібрили, що знаходиться під дією поперечної сили. $\sigma_{\max} = zLF_{\max}/8I$, де L – довжина фібрили; F_{\max} – максимальна сила, що виникає на нижній стороні поперечного перерізу фібрил на відстані $L/2$, якщо напруга створюється посередині фібрили.

Для фібрил інсуліну значення, наприклад, персистентної довжини, отримане методами аналізу флуктуацій та силової спектроскопії, подібні (таблиця 1.3).

Інші властивості. Амілоїдні фібрили мають різні (частіше низькі) значення діелектричної константи (наприклад для амілоїдних фібрил лізоциму та інсуліну отримали $\epsilon \sim 10$ та 25, на основі аналізу полярності сайтів зв'язування нільського червоного) [87]. З іншого боку, деякі агрегати (наприклад, амілоїдні фібрили poly(ValGlyGlyLeuGly) мають високу провідність та їх можна використовувати у якості нанодротів [88]. Крім того, як і колоїдні частинки у розчині, що мають великий гідродинамічний радіус, фібрилярні агрегати здатні добре розсіювати світло (розчин амілоїдних фібрил у кюветі непрозорий). Крім того, амілоїдні фібрили (наприклад, α -синуклеїну) мають добрі *адгезивні властивості* [88]. Зокрема, при аналізі адгезивних властивостей скадових субаеральних водоростей показано (методом флуоресцентної мікроскопії тіофлавіну Т та фарбування конго червоним), що саме наявність амілоїдних фібрил зумовлює добру асоціацію цих природних структур з різними поверхнями (наприклад, скляними) [89,90].

Розглянемо тепер фазову поведінку амілоїдних фібрил у воді. Амілоїдні фібрили – напівгнучкі колоїдні частинки, лінійна густина заряду яких залежить від їх амінокислотної послідовності та рН розчину. Для того, щоб отримати правильну фазову діаграму для розчинів амілоїдних фібрил треба змінювати зовнішні умови таким чином, щоб топологічні характеристики агрегатів залишались незмінними [52]. Типову фазову діаграму для фібрил β -

лактоглобуліну наведено на рис. 1.5. Як видно з рисунку, при масових концентраціях, нижчих за 5%, розчин рідкий та текучий; а вище цієї концентрації фібрили формують фазу гелю. Область текучості теж має синю смугу, що знаходиться навколо ізоелектричної точки білка (5.1), та відображає випадання амілоїдних фібрил в осад при зниженні лінійної густини заряду при $pH \approx pI$. Біла область характеризує колоїдні частинки з високою лінійною густиною заряду (позитивною при $pH < 3$, або негативною при $pH > 6.5$), що формують дисперсії. Важливою особливістю цієї фазової діаграми є той факт, що однофазні області діляться на ізотропну (за низької концентрації) та нематичну (вище порогової концентрації: при pH 3 вона складає 0.3%, при pH 7 – 0.2%). Ця властивість також характерна для інших напівгнучких біологічних колоїдних об'єктів, наприклад, фібрил целюлози (нематичний стан призводить до впорядкування амілоїдних фібрил, що можна використовувати для розробки

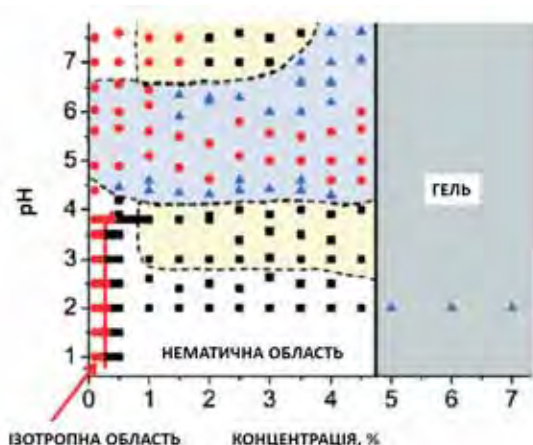


Рисунок 1.5. Фазова діаграма амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну у воді, виражена залежністю pH від концентрації суспензії. Біла область діаграми є однофазною; синя – двохфазною; блідно-жовта – напівпрозорою (агреговані дисперсії, що не випадають в осад); сіра – областю гелю. Взято з [52]

наноматеріалів). Переходи між ізотропним та нематичним станами характерні також для лізоциму та пептидів з нижчою молекулярною масою. Ізотропно-нематичний перехід в амілоїдних фібрилах описується теорією Онзагера, що включає ефекти двошарового заряду, їх тенденцію агрегувати у надфібрилярні структури та напівгнучку природу. За цією теорією ізотропно-нематичний перехід досягається при об'ємній фракції амілоїдних фібрил

Φ_{IN} :

$$\Phi_{IN} = c^* \frac{D^2}{D_{eff} L}, \quad (1.20)$$

де c^* – критичне значення концентрації амілоїдних фібрил довжини L та діаметру D ; D_{eff} – перевищує геометричний діаметр агрегатів, бо включає додатковий об'єм, що враховує двошарові електростатичні взаємодії. З формули (1.20) випливає, що якщо відомі густина заряду та іонна сила середовища, можна теоретично передбачити ізотропно-нематичний перехід. Наприклад, при зростанні рН та іонної сили знижуються лінійна густина заряду та довжина Дебая амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну, відповідно, що призводить до зниження D_{eff} [91].

1.2. Молекулярні механізми взаємодії амілоїдних фібрил зі специфічними хромо- та флуорофорами

Флуоресцентні барвники, що нековалентно зв'язуються з біологічними об'єктами, знайшли широке застосування у медико-біологічних дослідженнях, наприклад, у цитометрії, біотехнології, медичній діагностиці, секвенуванні ДНК, тощо [92,93,94]. На відміну від внутрішніх флуорофорів, вони мають істотно вищий флуоресцентний сигнал та характеризуються високою чутливістю до макропараметрів оточення: полярності, в'язкості, специфічних взаємодій. Окрім полярності та в'язкості, флуоресцентні зонди реагують на зміну таких характеристик оточення, як рН, температура, тиск, електричний потенціал, наявність водневих зв'язків, іонів, гасників, тощо, тому метод флуоресцентних зондів є дуже інформативним. Флуоресцентні біомаркери використовують у мікро- та наномолярних концентраціях, що викликає мінімальне збурення структури досліджуваного об'єкту [92]. Завдяки таким перевагам метод флуоресцентних зондів виявився ефективним при детектуванні амілоїдних фібрил поряд з іншими чутливими методами: а) атомною силовою та трансмісійною електронною мікроскопією (АСМ та ТЕМ) [95]; б) ядерним (електронним) (пара)магнітним резонансом (ЕПР та ЯМР) [54]; в) Фур'є-ІЧ-спектроскопією [95] та круговим дихроїзмом (CD) [36,96]; г) рентгеноструктурним аналізом (РСА) [97]; д) динамічним світлорозсіюванням [97]. Амілоїдний маркер повинен мати наступні властивості: а) високу

спорідненість до фібрилярних агрегатів ($\sim 1 \mu\text{M}^{-1}$), квантовий вихід флуоресценції (універсальний маркер має високий квантовий вихід незалежно від морфології та амінокислотного складу амілоїдних фібрил) та стехіометрію зв'язування; б) високі коефіцієнти екстинкції ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Стоксові зсуви та фотостабільність (а також стабільність у руслі крові, якщо зонд використовується *in vivo*); в) низьку спорідненість до нативного білка, бактерій, тощо; г) низький квантовий вихід у буфері; д) низьку цитотоксичність; е) високу ліпофільність ($\sim 1 - 3$) та невелику молекулярну масу ($< 600 \text{ Da}$), що дозволить проникати через гематоенцефалічний бар'єр (ГМТБ) для діагностики *in vivo* [6,99].

Ті ж самі флуоресцентні маркери можуть слугувати і хромофорами для детектування амілоїдних фібрил. Наприклад, Сулатська та співавтори розробили метод кількісного визначення амілоїдних фібрил лізоциму та інсуліну *in vitro* за допомогою вимірювань спектрів поглинання агрегатів у присутності тіофлавіну Т (ThT) [100]. Перевагою методу абсорбційної спектроскопії є, зокрема, відсутність ефекту самогасіння флуоресценції зонда при відносно високих концентраціях барвника (коли оптична густина розчину вище за 0.2). Для детектування амілоїдних фібрил використовують також специфічні хромофори – конго червоний (CR) та його аналоги. Для CR та ThT характерні червоні зсуви максимумів абсорбції і зростання поглинання при зв'язуванні з агрегатами білків [101,102].

Сольватохромні зонди (крім CR, до них також належать 1,8-ди-АНС, Нільський Червоний та ін.) можуть взаємодіяти з розчинником шляхом загальних ефектів (диполь-дипольні взаємодії, внаслідок чого відбувається релаксація розчинника навколо збуджених диполів зонда), що призводить до зміни максимуму та інтенсивності флуоресценції (максимум, як правило, зсувається у короткохвильову область, а квантовий вихід зростає у неполярному оточенні) [103]. Стоксів зсув зонда пропорційний до зростання дипольного моменту при збудженні. З іншого боку, неспецифічні ефекти розчинника (водневі та кислотно-основні зв'язки) теж відповідають за зміну

спектральних параметрів зонда, але їх важко врахувати при аналізі. Спектри флуоресценції сольватохромних зондів більш чутливі до змін полярності, ніж спектри поглинання. Для визначення величини Стоксового зсуву сольватохромних флуорофорів використовують рівняння Ліпперта-Матаги [104,105]. При перевищенні дипольним моментом збудженого стану дипольного моменту основного стану, при зростанні полярності оточення спостерігаються довгохвильові зсуви максимумів поглинання та флуоресценції барвників; в іншому випадку максимумами зсуваються у короткохвильову область [105]. Крім того, при зростанні полярності червоні зсуви спектрів поглинання хромофорів з $\pi \rightarrow \pi^*$ електронними переходами відбуваються також за рахунок утворення водневих зв'язків з розчинниками. Однак, якщо зонд має внутрішньомолекулярні водневі зв'язки, спектри поглинання можуть майже не змінюватися при варіюванні полярності [105]. Аналізуючи сольватохромні ефекти, можна судити про поляризованість, протон-донорну та електрон-донорну сили хромофора. Наявність протон-донорних розчинників (вода, етанол) призводить до значно вищих Стоксових зсувів, ніж за відсутності специфічних взаємодій [106,107]. Однак якщо залежність Стоксового зсуву від орієнтаційної поляризованості лінійна для деякої групи розчинників, то специфічних ефектів вони не мають.

Для іншого типу флуорофорів, *молекулярних роторів* (до них належать ThT, транс-стільбени, DCVJ, MHB), характерна висока чутливість квантового виходу флуоресценції до в'язкості оточення (квантовий вихід зростає разом із в'язкістю та знижується при зростанні температури) [108,109,110]. Природа такої чутливості полягає у торсійній релаксації зонда при збудженні: донорна частина молекули обертається відносно акцепторної через високу полярність збудженого стану зонда. При збудженні молекула знаходиться у непланарному, або TICT, стані, і квантовий вихід дорівнює нулю через порушення спряження між донором (Д) та акцептором (А). Такі молекули використовують для детектування в'язкості та вільного об'єму розчинника (навіть у живих клітинах), оскільки при високій жорсткості середовища при збудженні

флуорофор буде знаходитись у флуоресцентному локально збудженому, або LE, стані (оскільки торсійна релаксація обмежена) [111,112]. Бар'єр між станами LE та TICT залежить від характеристик оточення. Наприклад, для зонда DMABN він знижується у полярних та підвищується у в'язких розчинниках [112,113].

Далі розглянемо зв'язування CR та ThT з амілоїдними фібрилами. На сьогодні показано, що класичні амілоїдні маркери ThT та CR локалізуються у жолобках між боковими ланцюгами, що є типовою складовою крос-бета структури, та орієнтуються вздовж осі фібрили [114,115]. Ці сайти ініціюють характеристичну флуоресценцію ThT та подвійне променезаломлення CR, на відміну від альтернативних сайтів, таких як гідрофобні порожнини [1], суха поверхня розділу «стеричної блискавки» (гідрофобна сторона β -листа) [97], поверхня β -листа [97] та краї β -листа [116].

1.2.1. Детектування амілоїдних фібрил за допомогою конго червоного

Конго червоний спочатку використовували як рН індикатор, а у якості гістологічного барвника його вперше застосував П. Діврі при дослідженні дегенеративних змін мозку людей похилого віку [117]. Гідрофобний центр симетричного зонда складається з двох фенольних кілець, з'єднаних діазов'язками з двома зарядженими нафталеновими групами. Зонд знаходиться у хіноновій формі у кислому середовищі та у аніонній формі у лужному, змінюючи колір від синього ($\text{pH} < 3$) до червоного ($\text{pH} > 5$). Зв'язування CR з амілоїдними фібрилами супроводжується зсувом максимуму піку поглинання з 493 до 540 нм, тому цей зонд у присутності амілоїдних фібрил змінює колір з помаранчево-червоного на рожевий [129]. Крім того, зростає поглинання зонда (наприклад у присутності амілоїдних фібрил A β пептиду) [118]. Таким чином, CR належить до типу сольватохромних сполук, оскільки його спектри поглинання та флуоресценції залежать від рН, іонної сили та полярності оточення [119]. Однак, він проявляє і властивості молекулярних роторів:

підвищує квантовий вихід флуоресценції при зростанні планарності (зв'язуванні з амілоїдними фібрилами) [119].

CR може зв'язуватися з амілоїдними фібрилами за допомогою гідрофобних взаємодій бензидинових центрів, а також електростатичних взаємодій між негативно зарядженими сульфатними групами та позитивно зарядженими амінокислотними залишками (наприклад, гістидину A β -пептиду) різних протофіламентів [121]. Наприклад, дифенольні кільця CR добре зв'язувалися з гідрофобними зонами білків [122,123].

За допомогою молекулярного моделювання показано, що неполярна частина CR у жолобку модельної протофібрили (GNNQQNY) пріонного білка Sup35 формує ван-дер-Ваальсові зв'язки з гідрофобним залишком гліцину та двома залишками аспарагіну; групи SO₃ та NH₂ утворюють водневі зв'язки з протофібрилами [123]. У другій моделі зв'язування (перпендикулярно до осі фібрили) CR формує значно слабші гідрофобні зв'язки з протофібрилами (оточення зонда стає більш полярним), але сильніші стекінгові взаємодії нафталенового кільця із залишком тирозину. Молекулярне моделювання показало, що неполярна частина CR у жолобку модельної протофібрили (GNNQQNY) пріонного білка Sup35 формує ван-дер-Ваальсові зв'язки з гідрофобним залишком гліцину та двома залишками аспарагіну; групи SO₃ та NH₂ утворюють водневі зв'язки з протофібрилами [123]. У другій моделі зв'язування (перпендикулярно до осі фібрили) CR формує значно слабші гідрофобні зв'язки з протофібрилами (оточення зонда стає більш полярним), але сильніші стекінгові взаємодії нафталенового кільця із залишком тирозину. Зонд розташовується паралельно осі фібрили та перпендикулярно напрямку окремих поліпептидних ланцюгів, причому кожна молекула барвника у жолобку зв'язується з 6 β -ланцюгами [114,116]. Така орієнтація CR пояснює виникнення ефекту подвійного променезаломлення при зв'язуванні з фібрилярними агрегатами [124]. На показники заломлення органічних сполук у розчині впливають їх поляризованість, розподіл зарядів та здатність утворювати водневі зв'язки [125]. Амілоїдні фібрили, пофарбовані CR,

зазвичай, мають зелене подвійне променезаломлення у поляризованому світлі. Негативне та позитивне променезаломлення проводять синій та жовтий кольори, тому у результаті можна бачити амілоїдні фібрили зеленого кольору під поляризаційним мікроскопом [125]. Крім орієнтації паралельно осі фібрили, методом молекулярного моделювання показано, що CR може розташовуватися перпендикулярно осі або на краях β -листа амілоїдних протофібрил A β -пептиду [115]. Перші дві моделі можуть викликати порушення стекінгу сусідніх β -листів та β -ланцюгів (наприклад, CR руйнував 4 водневі зв'язки між β -ланцюгами фібрил інсуліну при інтеркаляції між β -ланцюгами); остання – характерна для нестероїдних ліків проти амілоїдів, що запобігають елонгації β -листів [126].

CR специфічно зв'язується саме з β -структурою амілоїдних фібрил, а не з нативним білком (як показано для інсуліну та деяких α -білків) [116,127]. Однак, за деякими даними, асоціація зонда з білком сильніше залежить від специфічного оточення зонда, а не від типу вторинної структури білка, тому при детектуванні амілоїдних фібрил можна отримати псевдопозитивні результати (CR зв'язується з β -лактоглобуліном, лізоцимом, апоміоглобіном) [127]. Цікаво, що саме здатність зонда зв'язуватись з нативними та частково денатурованими формами білків може пояснити дію CR як інгібітора фібрилогенезу [127]. З частково денатурованими білками CR навіть асоціює у вигляді паличкоподібних супрамолекулярних агрегатів (але не міцел, де гідрофобні частини заховані усередину), що характерні для розчину зонда у воді [128]. Агрегати CR утворюються за рахунок балансу електростатичного відштовхування та ароматичних міжмолекулярних взаємодій, при концентрації зонда, нижчій за 50 мМ, іонній силі, вищій за 50 мМ, та температурі нижче 60 °C [129]. Продemonстровано суттєву роль електростатичних зв'язків у зв'язуванні зонда з α -спіральною конформацією полі-L-лізину. В цілому, стеричні, гідрофобні, електростатичні взаємодії та водневі зв'язки забезпечують асоціацію барвника з фібрилами [95,130]. Зокрема, водневі та гідрофобні зв'язки характерні для асоціації зонда з бичачим сироватковим

альбуміном, оскільки для зв'язування CR з білком отримали негативне значення ентальпії та позитивне значення ентропії, відповідно [131]. Водневі зв'язки виникають між екзоциклічними NH_2 групами зонда та карбонільними групами пептидного остову [124]. Залишки лізину та фенілаланіну амілоїдних фібрил А β -пептиду забезпечують ароматичні та електростатичні взаємодії з CR [132]. Планарність зонда важлива для зв'язування з пріонним білком (вона також зумовлює посилення сигналу флуоресценції CR, зв'язаного з амілоїдними фібрилами) [120]. Флуоресценція CR (мікроскопія) виявилася навіть більш чутливим методом для детектування амілоїдних фібрил у зразках тканин хворих, ніж просте фарбування цих тканин [133]. У розчині молекула CR майже планарна (що сприяє утворенню супрамолекулярних агрегатів зонда), крім торсійного кута навколо центрального дифенольного зв'язку (як показано за допомогою неемпіричних квантово-хімічних розрахунків); планарність зонда може зростати усередині амілоїдних фібрил, сприяючи підвищенню константи зв'язування та квантового виходу флуоресценції [134].

При вимірюванні спектрів поглинання CR у присутності амілоїдних фібрил інсуліну отримано константу та стехіометрію зв'язування зонда з білком, що складали $\sim 0,5 \mu\text{M}^{-1}$ та 2, відповідно [119]. Детальне вивчення локалізації зонда на поверхні амілоїдних фібрил за допомогою ізотермічного калориметричного титрування показало наявність двох типів сайтів: з високою та низькою специфічністю (константи асоціації відрізнялися на 2 порядки) [132]. Загалом, константа асоціації зонда з амілоїдними фібрилами коливається у межах $0,07 - 10 \text{ мкМ}^{-1}$ (найнижче та найвище значення цього параметру спостерігались для фібрил А β -пептиду та інсуліну, відповідно). Стехіометрія зв'язування знаходиться у межах 0,1 – 42 (для амілоїдних фібрил полі-L-серину та полі-L-лізину, відповідно) [135]. Прикладом двохсайтової моделі взаємодії CR з фібрилами може бути зв'язування зонда у жолобках паралельно осі фібрили (специфічний сайт) та його інтеркаляція між β -ланцюгами перпендикулярно головній осі (неспецифічний сайт) [128]. Дійсно, оскільки відстань між β -ланцюгами дуже мала за рахунок щільної сітки водневих

зв'язків, зонда важко зв'язатися з фібрилою перпендикулярно її осі, тому ці сайти неспецифічні.

1.2.2. Тіофлавін Т та інші флуоресцентні маркери для амілоїдів

Тіофлавін Т вперше застосували П.С. Вассар та К.Ф. Куллінг у якості флуоресцентного маркера амілоїдних агрегатів у тканинах [114,136]. При зв'язуванні ThT з амілоїдними фібрилами флуоресценція зонда (яка майже відсутня у вільному стані) зростає до тисячі разів у залежності від морфології білкових агрегатів [137]. Значне зростання квантового виходу зонда при підвищенні в'язкості оточення вказує на його належність до класу молекулярних роторів (бензотіазольне та амінобензенове кільця взаємно закручені) [138]. Правомірність такої точки зору впливає з аналізу спектральної поведінки зонда у водно-гліцеринових сумішах та квантово-хімічних розрахунків [139,140,141]. Шляхом вимірювання флуоресценції тіофлавіну Т (ThT) вивчають не тільки кінетику росту амілоїдних фібрил [142], але і структуру білкових агрегатів [143,144] як *in vitro*, так і *in vivo* [145-147]. Анізотропію флуоресценції різних зондів, як міру в'язкості оточення, використовували з цією ж метою *in vitro* [148,149]. Крім вимірювання стаціонарних спектрів класичних амілоїдних маркерів, при детектуванні фібрилярних агрегатів також застосовують метод часороздільної флуоресцентної спектроскопії, вимірюючи кінетику затухання флуоресценції [145]. При дослідженні кінетики фібрилізації за допомогою тіофлавіну Т найбільшого розповсюдження набув метод, що базується на відбиранні аліквот розчину білка через певні проміжки часу, додаванні аліквот до розчину зонда певної концентрації, та реєстрації інтенсивності (або анізотропії) флуоресценції на довжині хвилі 480 нм. Для ThT характерні червоні зсуви максимумів поглинання з 413 нм до 449 нм, а також зростання інтенсивності поглинання при зв'язуванні з агрегатами білків [105,148]. Це відбувається завдяки стабілізації основного стану зонда релаксованими молекулами розчинника, тоді як у збудженому стані немає значного зсуву (спостерігається лише зсув з 493

нм до 478 нм) через наявність переносу заряду (нерівноважний стан) [149]. З цієї причини параметри зв'язування барвника з амілоїдними фібрилами можна знаходити методом абсорбційної спектроскопії [151].

Методами молекулярного моделювання показано, що ThT зв'язується з модельним β -листом за допомогою дисперсійних взаємодій, а також за рахунок водневих зв'язків NH-груп зонда з карбонільними групами поліпептидного остова [151]. У полярному розчиннику афінність ThT до амілоїдних фібрил падає у порівнянні з його нейтральними аналогами BTA та PIB, за рахунок вищої енергії сольватації. Важливо відзначити, що порівняно з CR, електростатичні взаємодії відіграють меншу роль у зв'язуванні ThT з амілоїдними фібрилами, але ThT так само розташовується у жолобках паралельно осі фібрили (методом молекулярного моделювання продемонстрована стабільність таких комплексів) [151]. Дані молекулярного моделювання Біанкалани показали, що ThT має найвищу специфічність до жолобків, утворених ароматичними залишками амінокислот (наприклад, жолобків із залишків Val та Phe або Tyr та Leu) [114]. Крім того, зв'язування ThT з ароматичними залишками периферійного сайту ацетилхолінестерази призводило до зростання квантового виходу у 1000 разів [153]. Наявність водневих, електростатичних та ван-дер-Ваальсових зв'язків показано для асоціації барвника зі специфічним сайтом фібрил інсуліну, тоді як при неспецифічній асоціації переважали гідрофобні контакти [1]. π -стекінг та гідрофобні взаємодії з ароматичними амінокислотними залишками білків теж підвищують афінність ThT до фібрилярних білкових агрегатів [153].

В цілому, ThT проявляє специфічність не до всіх амілоїдних фібрил: його константа асоціації коливається у межах від 0.2 до 30 мкМ^{-1} для амілоїдних фібрил інсуліну та AA-пептиду, відповідно; стехіометрія зв'язування – від 0.01 до 0.9 для фібрил HET та інсуліну, відповідно [135]. Зокрема, константа асоціації ThT з фібрилами інсуліну $\sim 0.1 \text{ мкМ}^{-1}$, а стехіометрія зв'язування ~ 0.12 , причому характеристична флуоресценція барвника виникає тільки при зв'язуванні зі специфічним сайтом (усього знайдено 2 сайти методом

калориметричного ізотермічного титрування) [1]. Аналогічно, і квантовий вихід молекулярного ротора залежить від морфології амілоїдних фібрил: наприклад, його значення були 0,8 для фібрил інсуліну та 0,44 для фібрил лізоциму, що свідчить про значно меншу рухливість молекулярних груп в мікрооточенні зонда в фібрилах першого типу [154].

Згідно з класичною моделлю М.Р. Кребса, ThT локалізується у жолобках паралельно осі фібрили, причому одна молекула зонда зв'язується з 5 β -ланцюгами [155]. Ця модель отримала підтвердження при РСА кристалів зонда з амілоїдними фібрилами $A\beta_{1-42}$ [156]. Молекулярне моделювання показало, що існує декілька мод зв'язування ThT з амілоїдними фібрилами, де важливу роль відіграють ароматичні та гідрофобні взаємодії, причому 55% молекул зонда зв'язувалось у жолобках між боковими залишками амінокислот [157]. Отримано докази розташування зонда у центральному жолобку протофіламента фібрил інсуліна, що має порожнисту середину, паралельно осі фібрили [1]. Таким чином, моделі зв'язування ThT та CR з амілоїдними фібрилами дуже схожі, але параметри зв'язування відрізняються через різну молекулярну структуру зондів. Слід зауважити, що локалізація зонда перпендикулярно осі фібрил майже неможлива, через наявність «стеричної блискавки», тобто щільного пакування бокових залишків амінокислот гідрофобних поверхонь сусідніх β -листів [158]. Так само і асоціація зонда на краях β -листів зустрічається рідко. Поряд з цим існують дані, що свідчать про можливість зв'язування ThT з β -структурами нативних білків, як було показано, зокрема, для транстиретину [1]. Примітно, що у більшості робіт мова йде тільки про мономерну форму ThT, хоча не виключена можливість зростання квантового виходу флуоресценції зонда внаслідок асоціації міцелярних форм ThT (у концентрації понад 4 мкМ) з амілоїдними фібрилами, як було продемонстровано у роботі Р. Курани для інсуліну, імуноглобуліну та інших білків [159].

На відміну від CR, ThT не запобігає формуванню амілоїдних фібрил, тому його частіше використовують як амілоїдний маркер [160]. Крім того, зонд

навіть може сприяти формуванню агрегатів білка $A\beta_{1-40}$, стабілізуючи його амілоїдогенну конформацію [161]. Високі концентрації зонда токсичні для живих організмів. Також ThT чутливий до рН оточення, як і CR, а при лужних рН спостерігається гідроксилування молекули ThT, що призводить до гасіння флуоресценції [162].

Незважаючи на широке застосування ThT та CR при детектуванні амілоїдних структур, слід мати на увазі, що ці маркери все ж мають низку недоліків, як то: а) висока чутливість до нативного білка або бактерій; б) повільна кінетика зв'язування; в) залежність спектральних ефектів від амінокислотної послідовності, рН та іонної сили розчину (низький квантовий вихід у присутності амілоїдних фібрил певної морфології); г) заряд, що обмежує проникнення через ГМТБ при використанні зонда *in vivo*, тощо [133,135]. Тому подальше удосконалення діагностики «конформаційних» захворювань потребує пошуку більш ефективних амілоїдних маркерів. Багато нових зондів різних класів, наприклад, DCVJ [145], ді-АНС[148], триметінціаніни T-49, T-274 [163], похідні стильбена [164], CRANAD-2 [165] вже успішно впроваджено у діагностичну практику *in vivo* та *in vitro*. Серед методів флуоресцентної діагностики *in vivo*, варто виділити молекулярне оптичне зображення (мультифотонне зображення та зображення у ближній інфрачервоній області), де використовуються специфічні флуоресцентні зонди, наприклад, похідна куркуміна – CRANAD-2 [165]. Зупинимось детальніше на деяких найбільш перспективних зондах.

Сполука В Пітсбурга (PIB) – нейтральна похідна ThT, яка глибше занурюється у гідрофобні та ароматичні жолобки уздовж осі фібрили $A\beta$ -пептиду, ніж ThT [166]. Внаслідок цього PIB має вищу афінність, стехіометрію зв'язування та квантовий вихід у присутності фібрилярних агрегатів білка. Крім того, ^{11}C -мічений PIB добре проникав у мозок мишей, тому його використовували для візуалізації амілоїдних відкладень у мозку методом ПЕТ [167]. Нейтральні аналоги ThT – БТА-0, БТА-1, БТА-2 та ThS мали у декілька разів вищу афінність та квантовий вихід флуоресценції у присутності

амілоїдних фібрил $A\beta_{1-40}$ [168]. Похідна оксазину АОІ987, що добре проходить через ГМТБ, дозволила візуалізувати *in vivo* фібрили $A\beta$ -пептиду у ближній інфрачервоній області [169]. Синій гідрольний Міхлера (МНВ), молекулярний ротор, на відміну від ThT, може розрізняти амілоїдні фібрили інсуліну та лізоциму (за зсувами максимумів флуоресценції) [170]. Методом лінійного дихроїзму показано, що цей зонд зв'язується у жолобках амілоїдних фібрил під кутом $14 - 22^\circ$ до головної осі. Цим же методом отримано докази на користь аналогічного характеру зв'язування кумасі синього з амілоїдними фібрилами інсуліну [171]. Крім того, продемонстровано, що за положенням максимумів поглинання та флуоресценції цього зонда, можна розрізнити амілоїдні фібрили лізоциму, інсуліну, а також нативні форми цих білків. Інший барвник, Тіазоловий Помаранчевий показав 400-кратне зростання квантового виходу флуоресценції у присутності амілоїдних фібрил лізоциму (що у 8 разів перевищувало чутливість ThT) і менший вплив на кінетику агрегації білка, порівняно з ThT [172]. Такий результат зумовлений як стеричними факторами, так і формуванням Н-агрегатів барвника при асоціації з амілоїдними фібрилами. Крім молекулярних роторів, сольватохромні зонди теж придатні для детектування фібрилярних білкових агрегатів, як це показано при вивченні взаємодії нільського червоного (NR) з фібрилами лізоциму, інсуліну, транстиретину, $A\beta$ -пептиду. Примітно, що, на відміну від ThT, спектральні зміни NR не залежали від рН середовища [87]. Квантовий вихід флуоресценції NR пропорційний до гідрофобності його сайтів зв'язування. Залежність максимуму флуоресценції зонда від полярності дозволила визначити діелектричну проникність мікрооточення зв'язаного з фібрилами флуорофору, а вивчення резонансного переносу енергії у донорно-акцепторній парі ThT–NR – охарактеризувати морфологію агрегатів. Недоліками NR як амілоїдного маркера є висока чутливість до ліпідів і низька розчинність у воді.

1.3. Амілоїдні фібрили як новий клас наноматеріалів

Вищезазначені унікальні властивості амілоїдних фібрил, їх здатність утворювати четвертинну структуру та залежність морфології від хімічних модифікацій дозволяють використовувати ці агрегати для створення нових наноматеріалів: біологічних клеїв [173], поверхонь для підтримки клітинних культур (рис. 1.6Ж) [174], нанодротів [175], рідкокристалічних фаз, тощо [176]. Поліпептиди як основа для пластичних матеріалів, мають низку переваг над традиційними синтетичними полімерами: постійну довжину; специфічність та складність структури; низька швидкість кристалізації, тощо [5].

Перевага біологічної самозбірки – у її здатності до генерації та контролю структури на нанорівні (рис. 1.6А) [81]. Її можна використовувати у якості шаблону для інших матеріалів, що не схильні формувати упорядковані структури. Наприклад, частинки металів адсорбуються на поверхні амілоїдних фібрил, що призводить до утворення провідних дротів (рис. 1.6Б) [177,178]. Дифенілаланінові нанотрубки мають порожнисте ядро, а відкладення частинок металів уздовж цих трубок дозволяє створити коаксіальні нанодроти з електромагнітними властивостями (рис. 1.6Ж) [179]. Наноструктури на основі амілоїдних фібрил також використовують для створення електрохімічних біосенсорів, у тканинній інженерії та для молекулярної візуалізації.

1.3.1. Застосування амілоїдних структур у біології та медицині

Для медичних застосувань на основі амілоїдних фібрил створюються біосумісні лікарські препарати [24]. Ефекту їх тривалої дії можна досягти шляхом повільної дисоціації пептидних наноструктур (мономер, що і є лікувальним засобом, вивільняється з кінця фібрили) після сигналу. Такий підхід був апробований, зокрема, для терапії раку (коли сигнал генерувався за допомогою гормону, що синтезує гонадотропін) [180]. Амілоїдні фібрили формують стабільне депо для пептидних ліків зі 100% вмістом, стабільність якого можна підвищити за рахунок асоціації з амілоїдом Р та глюкозаміногліканами організму [180]. Також цей підхід є корисним і для відновлення клітин мозку шляхом регенерації аксонів (рис. 1.6Ж) або ж для

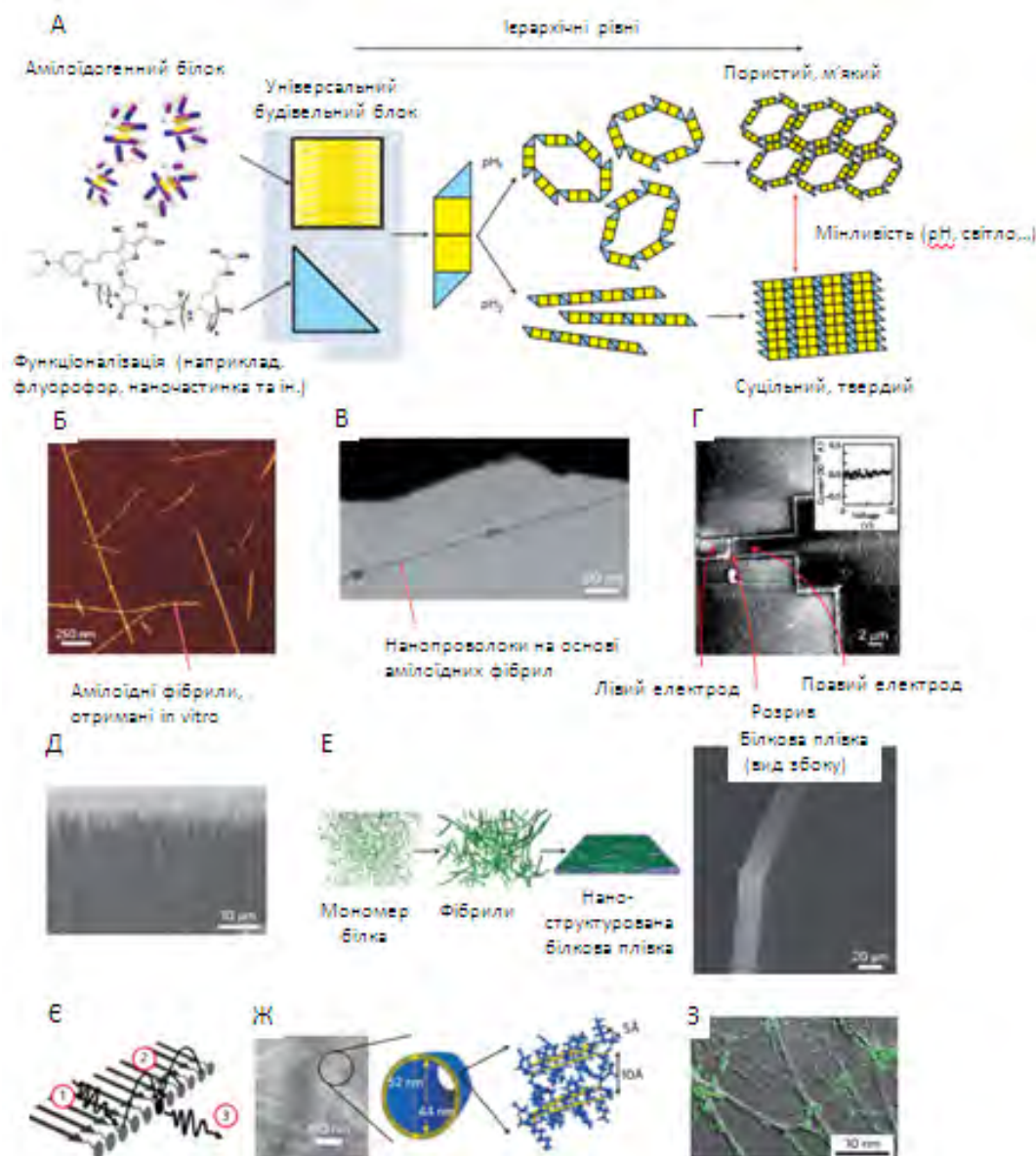


Рисунок 1.6. Приклади функціональних синтетичних амілоїдних матеріалів. Формування амілоїдних фібрил з нативного білка дає універсальні будівельні блоки, що можуть формувати комплекси, наприклад, з флуорофорами або металевими частинками та набувати різноманітних нових функцій (А). АСМ зображення амілоїдних фібрил, отриманих in vitro (Б). Асоціація фібрил та утворення електропровідних нанодротів (В,Г), покриття для поверхонь (Д) та наноструктурних білкових плівок (Е). Схематичне зображення світлозбиральних наноструктур, отриманих з амілоїдних фібрил. Світло збирається шляхом поглинання фотону донором, що передає енергію акцептору шляхом резонансного переносу. Енергія вивільняється акцептором, що випромінює фотон (Є). Порожнисті нанотрубки, зроблені з амілоїдних структур, можуть використовуватися для створення наноантен (Ж). Оптичні зображення активних нейронних синапсів (мічених зеленим флуоресцентним ліпофільним зондом стиролового ряду), що їх ріст стимульовано за допомогою багатих на β -листи основ. Взято з [81]

модулювання процесу адгезії клітин (рис. 1.6С) [181,182]. Варто відзначити, що ці методи базуються на здатності амілоїдних фібрил до деградації при високій температурі, в кислому або лужному середовищі, або ж під дією протеаз, тоді як у інших випадках використання амілоїдів у розробці наноматеріалів ця властивість є недоліком [183]. На основі амілоїдних фібрил також був створений біосенсор на глюкозу з покращеними властивостями, шляхом поєднання білкових нанотрубок з глюкозооксидазою та розташування цього комплексу на золотому електроді [184]. Додаткова іммобілізація ферменту за допомогою амілоїдних нанотрубок суттєво підвищила стабільність, чутливість та час життя наносенсора. На основі амілоїдних фібрил також було створено модельні біологічні системи транспорту електронів з двох SH₃ доменів та функціонального домену цитохрома b₅₆₂ *E. coli* [185]. Отриманий полімер характеризувався високою щільністю металопорфіринів, розташованих на поверхні амілоїдних фібрил. Амілоїдні фібрили поліпептиду ValGlyGlyLeuGly мали високу електропровідність та стабільність у твердому стані, тому їх можна використовувати для створення біоелектронних пристроїв [186]. Нарешті, на основі амілоїдогенних фрагментів транстиретину синтезували амілоїдні фібрили, що мають здатність зв'язувати клітини ЗТЗ шляхом адгезії. Такі біоактивні (функціоналізовані) амілоїдні фібрили можна використовувати для вивчення адгезії, міграції та диференціації клітин *in vitro*. Амілоїдні фібрили яєчного лізоциму були перетворені у макроскопічні волокна, використовуючи полііонний полісахарид у якості зшивки [187]. Отримані фібрили мали жорсткість 14 ГПа та міцність розриву 326 МПа. Також ці фібрили з однаковою орієнтацією у гумовій матриці мінералізували за допомогою фосфату кальцію, моделюючи фіброламельярну структуру кісток, та отримали зростання жорсткості у 9 разів. Крім того, фібрилярний матеріал мав здатність до вивільнення молекул при варіюванні рН середовища. Ці властивості дозволяють використовувати амілоїдні фібрили у якості поліелектролітних матеріалів (наногелів та колоїдів) та для цілеспрямованої доставки ліків.

1.3.2. Амілоїдні фібрили як можливий компонент нанопристроїв

На основі амілоїдних фібрил створено нанодроти, нанотрубки та поверхні, що можуть використовуватися у технічних пристроях (рис. 1.7В, Г, Є, Ж). Цікаво, що у порівнянні з молекулами ДНК, які також використовують у якості остову для нанодротів, білки мають вищу хімічну та біологічну гнучкість і різну морфологію. Прикладом остову для створення нанодротів є білки дріжджів з високим вмістом цистеїну [188]. Тіолові групи слугують сайтами нуклеації для металізації амілоїдних фібрил. Генетично модифіковані пріонні білки формують амілоїдні фібрили, котрі після асоціації з частинками золота чи срібла утворюють провідники діаметром 80 – 100 нм [177]. Аналогічно, асоціація амілоїдних фібрил фрагменту Sup35 (що містить тіолові групи) та колоїдних частинок золота/ срібла призвела до формування нанодротів діаметром 100 нм [176]. Формування срібних нанодротів діаметром 20 нм у порожнистій серцевині нанотрубок на основі амілоїдного дипептиду показано Речетом [175]. В іншій роботі дифенілаланінові пептидні нанотрубки було закріплено горизонтально (за допомогою залізовмісної рідини та магнітного поля) або вертикально (утворення «нанолісу» досягли шляхом аксіального однонаправленого росту щільно розташованих пептидних трубок) [174]. Властивості отриманих у цій роботі поверхонь можна використовувати для розробки сенсорів з високою щільністю функціональних одиниць. Цікаво, що саме дифенілаланіновий мотив А β -поліпептиду здатен формувати упорядковані нанотрубки з високою персистентною довжиною. Поряд з цим, ароматичні гомодипептиди здатні утворювати наносфери, нанолисти, нанофібрили та гідрогелі з високою жорсткістю. За допомогою покриття амілоїдних фібрил інсуліну високопровідним полімером алкоксисульфонатом PEDOT, сформували наноматеріал для виготовлення транзисторів, що функціонують при напрузі 0 – 0,5 В [189]. Серед усіх функціональних матеріалів важливе місце займають наноплівки з амілоїдних фібрил (рис. 1.7Е) [190]. Такі плівки дуже жорсткі (мають модуль Юнга ~5 – 7 ГПа, подібно до кератину та колагену). Наприклад, плівки лізоциму та β -лактоглобуліну синтезували, додаючи у гідрогель

амілоїдних фібрил гліцерин або поліетиленгліколь; потім отриманий розчин поміщали на поліетиленову плівку та висушували, отримуючи пластини з амілоїдних фібрил. Плівка з фібрил лізоциму (що містила поліетиленгліколь) мала виражене нематичне упорядкування, що дозволило використати її для функціоналізації флуоресцентного зонда тіофлавіну Т. Зокрема, амілоїдні фібрили лізоциму у нематичній фазі упорядковували молекули тіофлавіну Т, що входив до складу наноплівок. Внаслідок цього однонаправлені дипольні моменти зонда випромінювали поляризоване світло [190].

1.4. Висновки

1. Амілоїдні фібрили – високовпорядковані агрегати білків, утворення яких відбувається шляхом нуклеації-полімеризації, завдяки особливому балансу електростатичних та гідрофобних міжмолекулярних взаємодій частково денатурованих мономерів.
2. Зв'язування хромо- та флуорофорів з амілоїдними фібрилами здійснюється, головним чином, за рахунок ван-дер-Ваальсових, ароматичних та гідрофобних взаємодій у жолобках, утворених боковими залишками амінокислот, паралельно осі фібрили.
3. Пошук нових флуоресцентних зондів для детектування фібрилярних агрегатів є виключно актуальною науковою задачею, вирішення якої дозволить істотно удосконалити методи медичної діагностики «конформаційних» захворювань.
4. Унікальні фізичні властивості амілоїдних фібрил, з одного боку, зумовлюють їх токсичну дію в організмі, а з іншого боку, створюють передумови для використання фібрилярних білкових агрегатів у якості нового класу наноматеріалів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

У роботі використовували лізоцим з яєчного білка, інсулін підшлункової залози бика, родамін 101 (Rh101), тіофлавін Т (4-(3,6-диметил-1,3-бензотіазол-3-іум-2-іл)-N,N-диметиланілінхлорид), нільський червоний (9-диетиламіно-5Н-бензо[альфа]феноксазин-5-один), 8-аніліно-1-нафталено-сульфонову кислоту (1,8-АНС) (усі із SIGMA, США); конго червоний (динатрієва сіль 3,3'-[(1,1'-дифенил)-4,4'-диілди(азо)]ди-(4-аміно-1-нафталенової кислоти) (Aldrich, США). Фрагменти 1-83 аполіпопротеїну А-I: G26R/W50F_W72F (M3), G26R (G26), G26R/W8F_W50F (M1), G26R/W8F_W72F (M2), апоA83 (A83) було синтезовано в університеті Токушими (м. Токушіма, Японія) [191]. Бензантронові зонди було синтезовано в Даугавпілському університеті (м. Даугавпілс, Латвія), рис.2.1 [8,192]. Сквараїнові зонди та похідні ThT було синтезовано в Університеті Софії «Святий Клімент Охридський» (Софія, Болгарія), рис. 2.2.

Стокові розчини ThT готували у натрій-фосфатному буфері, бензантронових зондів, похідних ThT, CR, NR готували в етанолі, а сквараїнів – у DMSO. Стоковий розчин 1,8-АНС готували у буфері. На рис. 2.2 також наведені структурні формули ThT та CR.

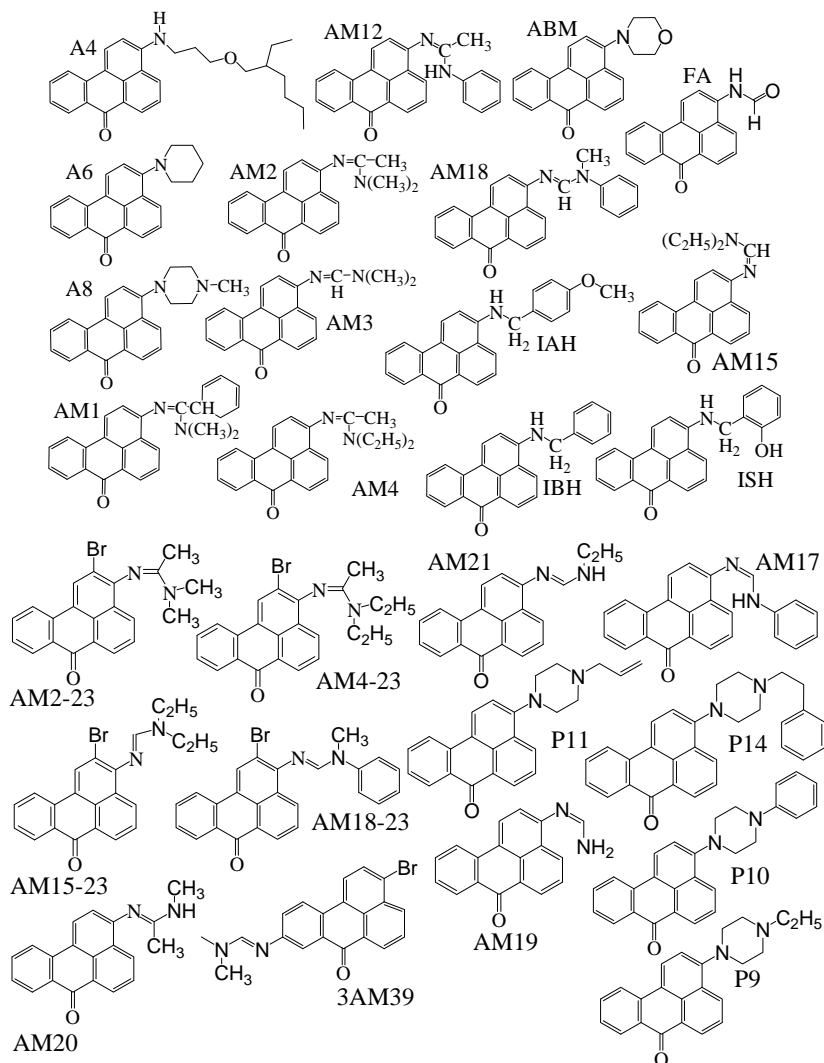


Рисунок 2.1. Структурні формули бензантронових зондів

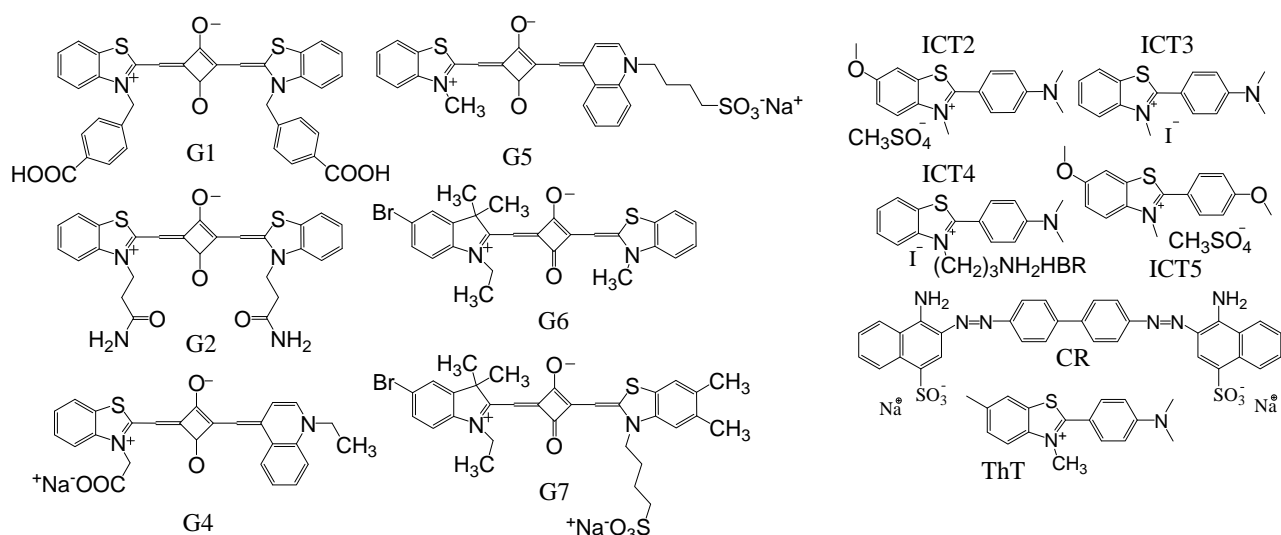


Рисунок 2.2. Структурні формули скварайнових зондів (G1, G2, G4, G5, G6, G7), похідних ThT (ICT2, ICT3, ICT4, ICT5), ThT та CR

2.2. Об'єкти досліджень

Амілоїдні фібрили інсуліну та лізоциму було отримано декількома способами (таблиця 2.1). Для приготування агрегатів білка при рН ~2 використовували гліциновий буфер (10 мМ); рН 7,4 – натрій-фосфатний буфер для лізоциму, або Tris буфер (10 мМ, 150 NaCl, 0,01% NaN₃) – для фрагментів аполіпопротеїну А-I (апо-А-I).

Таблиця 2.1

Умови приготування амілоїдних фібрил, використаних у роботі

Позначення	Білок	Концентрація білка	рН	Т, °С	Етанол, %	Тип перемішування	Кількість діб	Посилання
F _{acs}	лізоцим	20 мг/мл	1,6	60	0	шейкінг	19	[193,194]
F _{ac}	лізоцим	10 мг/мл	2,2	60	0	-	6	[98,194]
F _{eth}	лізоцим	3 мг/мл	7,4	25	80	магнітна мішалка	30	[195]
Ins _{ac}	інсулін	10	1,6	60	0	-	14	[196]
Ins _{acs}	інсулін	2,5	1,6	60	0	шейкінг	1	[197,198]
Ins _{acst}	інсулін	2,5	1,6	37	0	шейкінг	10	[198]
Фрагменти апо-А-I		100 мкМ	7,4	37	0	шейкінг	18	[199]

Бензантронові зонди широко використовуються у медико-біологічних дослідженнях та виробництві. Наприклад, перший синтезований зонд цього класу, МВА, був репортером в'язкості мембран, конформаційних змін білків та ДНК [200,201], а його похідні також знайшли застосування у якості барвників для тканин та полімерів, флуоресцентних пігментів денного світла та лазерних зондів [202,203]. Недоліком МВА є токсичність для живих клітин. Інший барвник, АВМ, виявився добрим репортером для вивчення в'язкості мембран лейкоцитів, структурних змін мембран лімфоцитів та альбуміну у пацієнтів з різними патологіями [10,204,205]. Популярність цього класу флуорофорів пояснюється їх особливими властивостями: високими коефіцієнтами екстинкції ($\sim 10^3$ – 10^4 М⁻¹см⁻¹), Стоксовими зсувами (~ 150 нм), термо- та фотостабільністю

[8]. Крім того, акцепторна природа карбонільної групи цих молекул та багата електронами аміногрупа у позиції С-3 викликають перерозподіл заряду при збудженні зондів, тому вони чутливі до полярності і в'язкості мікрооточення [9]. Завдяки властивостям, зазначеним вище, подальше тестування нових флуорофорів є дуже перспективним.

Сквараїнові зонди широко використовуються для дизайну сенсорів [206,207], біологічного мічення [11,208,209], у фотопровідних пристроях [210,211] та у фотодинамічній терапії (ФДТ) [212,213]. У розчині ці органічні сполуки мають вузьку полосу поглинання в області «фототерапевтичного вікна» (600–1000 нм), у якому глибину проникнення світла у тканини підвищується [214]. Сквараїни виявилися ефективними маркерами для вивчення білок-ліпідних взаємодій, наприклад у лізоцим-ліпідних системах [214,215], структурних модифікацій молекул білків [216,217]. Важливо синтезувати сквараїнові сполуки, що мають: низьку чутливість до нуклеофільних атак (наприклад, у спиртових розчинниках) [218], високу розчинність у воді [219] та високу чутливість до білків та ліпідів [217,220].

Відомо, що «ThT критерій» – найпопулярніший метод для детектування амілоїдних фібрил [221,222]. З метою підвищення чутливості та специфічності цього методу проводяться тестування різноманітних похідних цього зонда [223–225]. Наприклад, взаємодію похідних ThT з фібрилами Аβ вивчали з метою створення ідеального маркера для хвороби Альцгеймера [226]. Існують деякі структурні вимоги для досягнення вищої афінності похідних ThT до амілоїдних фібрил, а саме: нейтральний заряд [166,168], наявність донора водневого зв'язку [152] або замісників з високою поляризованістю та гідрофобністю бензотіазольної та фенольної частин [166,226]. Наприклад, за допомогою нейтральної похідної ThT, PIV, успішно діагностували AD *in vivo* [227]. У водно-гліцеринових сумішах або у присутності амілоїдних фібрил квантовий вихід ThT зростає у 1000 раз відносно буфера, що свідчить про відсутність стану TICT у даному випадку [114,137]. Однак, наприклад, похідна ThT BTA-2 має нижчу афінність та «флуоресцентну відповідь» у присутності Аβ-фібрил,

ніж ThT, але значно вищий квантовий вихід у буфері. Це пояснюється низькою вірогідністю сформувати стан ТІСТ при збудженні (енергії ТІСТ та LE близькі) [112,138]. Таким чином, важливим є тестування нових похідних ThT для успішного дизайну флуоресцентних амілоїдних маркерів.

2.3. Електронна мікроскопія

Для підтвердження наявності амілоїдних фібрил у розчині використовували метод TEM (мікроскоп Теспаї 12 BioTWIN, крім амілоїдних фібрил F_{eth} , для яких використовували мікроскоп Jeol JSM-840). Для цього 10

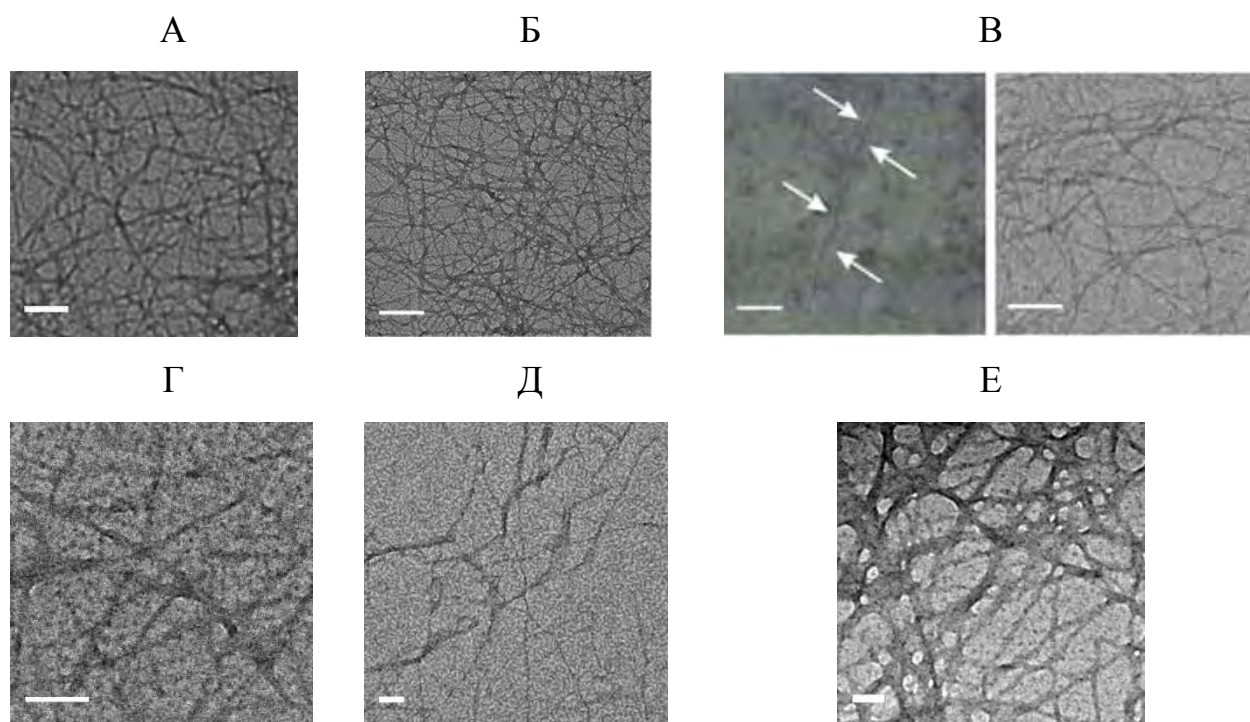


Рисунок 2.3. Електронна мікрофотографія фібрил лізоциму F_{acs} (82 мкМ). Довжина фібрил $\sim 1,9 \pm 0,2$ мкм, ширина $\sim 17 \pm 2$ нм (А). Електронна мікрофотографія фібрил інсуліну Ins_{acs} (354 мкМ). Довжина фібрил становила $1,3 \pm 0,3$ мкм, діаметр – 12 ± 1 нм (Б). Електронні мікрофотографії фібрил лізоциму F_{eth} (~ 130 мкМ) (В, ліворуч) та F_{ac} (~ 685 мкМ) (В, праворуч). Електронна мікрофотографія фібрил інсуліну Ins_{ac} (Г). Електронні мікрофотографії фібрил варіантів М3 (Д) та G26 (Е). Концентрація білка становила 30 мкМ (Д, Е). Шкала: 200 нм (А, Б, В (ліворуч)); 100 нм (В (праворуч), Г, Д); 50 нм (Е)

мкл стокового розчину білка (або розведеного у кілька разів) розміщали на поверхню мідного ґріду з карбоновим покриттям, рештки розчину збирали фільтром через одну хвилину. Далі на поверхню ґріду наносили 10 мкл 2% розчину уранілацетату, видаляючи залишки барвника через 30 секунд. На останньому етапі приготування зразків ґрид промивали дистильованою водою (MQ) та висушували на повітрі. Готові зразки аналізували за допомогою електронного мікроскопа [228]. Електронні фотографії різних амілоїдних фібрил наведено на рис. 2.3.

2.4. Спектри кругового дихроїзму

За допомогою спектрів кругового дихроїзму фібрилярних агрегатів також отримували докази на користь фібрилізації лізоциму. Зокрема, судили про вміст β -структури у агрегатах білка. Спектри кругового дихроїзму вимірювали в інтервалі 200 – 260 нм за допомогою спектрополариметру JASCO J720 у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 2 мм при $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [229]. Шаг вимірювань становив 0,25 нм, усереднений час – 2 секунди. Контрольні зразки буферу вимірювали за таких самих умов, а потім віднімали їх спектри зі спектрів амілоїдних фібрил [230]. Результуючий спектр визначали як середнє значення кривих 3-х послідовних вимірювань. Вимірювані значення еліптичності перераховували у *молярну еліптичність* за формулою [229]:

$$[\theta] = \frac{m \deg \cdot MRW}{l \cdot C}, \quad (2.1)$$

де $m \deg$ – кут, тангенс якого дорівнює відношенню побічної осі еліпса, по якому поляризоване світло, до головної осі; $MRW = \frac{MW}{N-1}$ – середня вага залишків білка, MW – молекулярна маса білка (14600 та 6080 для лізоциму та інсуліну, відповідно), N – число амінокислотних залишків білка; l – оптичний шлях; C – концентрація білка (мг/мл).

Спектр кругового дихроїзму нативного лізоциму мав характерні для α -спіралі мінімуми – 210 та 222 нм (рис. 2.4), і такі самі значення еліптичності у мінімумах, що і спектр, отриманий, наприклад, у роботі П. Као [231]. У свою чергу, спектр фібрилярного білка мав характерний для β -структури мінімум – 218 нм та знижений рівень α -структури (мінімум 208 нм зникає), і був схожий на той, що отриманий для фібрил лізоциму у роботі М. Холлі [195]. Поведінка

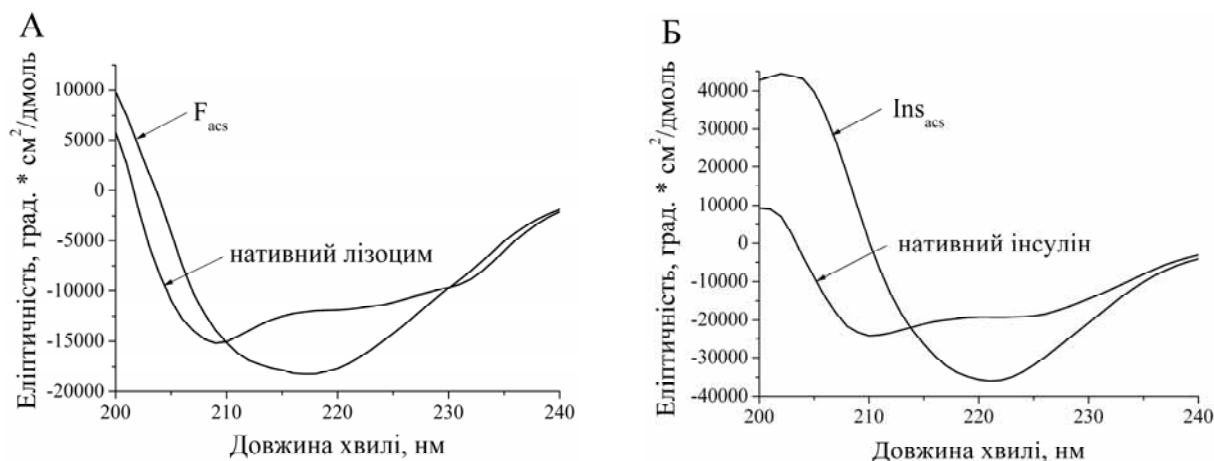


Рисунок 2.4. Спектри кругового дихроїзму нативного та фібрилярного лізоциму (F_{acs}). Концентрація лізоциму була 12 мкМ (ліворуч). Спектри кругового дихроїзму нативного та фібрилярного інсуліну (Ins_{acs}). Концентрація інсуліну була 33 мкМ (праворуч). Із спектрів кругового дихроїзму білка віднімали лінії буфера, що коливались близько нуля

спектрів кругового дихроїзму інсуліну схожа на ту, що показана у роботі Й. Муралі [232]. Зокрема, пік α -спіралей на 210 нм знизився у спектрах кругового дихроїзму агрегатів інсуліну, у порівнянні з нативним білком, а пік на 218 нм зріс, що означає збільшення вмісту β -структури [233]. Аналогічна картина спостерігалася для амілоїдних фібрил F_{acs} , що співпадала з даними С. Годи для амілоїдних фібрил лізоциму [6].

2.5. Спектроскопічні вимірювання

Спектри поглинання бензантронових зондів та похідних ThT в етанолі, розчинів лізоциму, інсуліну у натрій-фосфатному (5 мМ, рН 7,4) або гліциновому (10 мМ, рН 1,6) буферах, а також сквараїнових зондів у ДМСО та

Таблиця 2.2

Основні фото-фізичні властивості бензантронних зондів в етанолі

Зонд	A4	A6	ABM	AM1	AM2	AM3	AM4	AM12	AM15
ε	15488	10233	9263	19009	12023	13183	13804	7047	14093
λ_{abs}	530	455	444	470	470	469	472	469	475

Зонд	AM18	IAN	IBH	ISH	A8	3AM39	P10	AM2-23	AM4-23
ε	13490	4000	5339	6637	8511	10657	10000	10509	11548
λ_{abs}	465	524	531	529	444	474	446	451	462

Зонд	AM15-23	AM20	AM17	AM19	AM21	FA	P9, P11	P14	AM18-23
λ_{abs}	16041	10547	14125	25119	9772	25119	10000	10000	10000
ε	448	443	464	421	446	420	446, 452	446	448

Таблиця 2.3

Основні фотофізичні властивості похідних ThT у натрій-фосфатному буфері (5 мМ, рН 7.4) та сквараїнів у DMSO

Зонд	ICT2	ICT3	ICT4	ICT5	G1	G2	G4	G5	G6	G7
ε	$7,7 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	7500	$1,79 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$
λ_{abs}	397	388	362	328	682	677	675	682	652	649

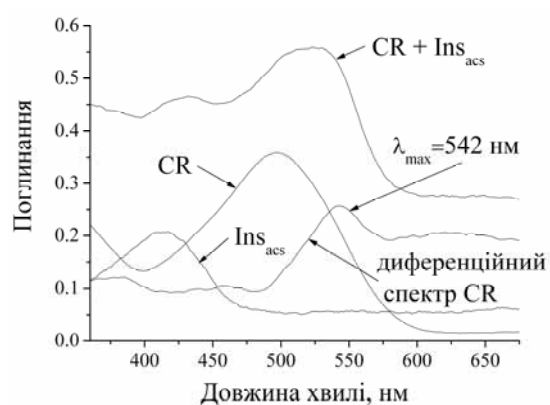
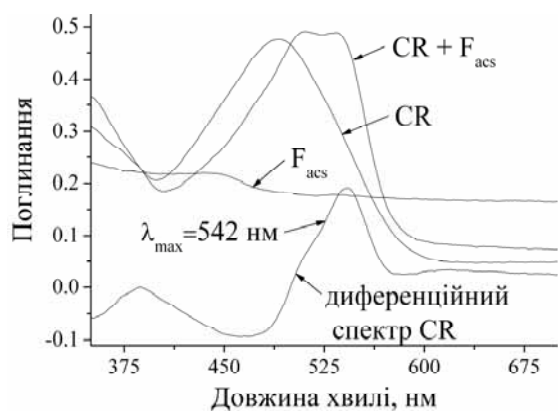


Рисунок 2.5. Спектри поглинання вільного конго червоного (CR), зонда у присутності F_{acs} ($CR + F_{acs}$), фібрил лізоциму (F_{acs}) та диференційний спектр CR, отриманий як різниця між спектром зв'язаного барвника та суми спектрів вільного зонда і агрегатів білка. Концентрації білка та CR склали 120 та 48 мкМ, відповідно (ліворуч). Спектри поглинання вільного конго червоного (CR), зонда у присутності Ins_{acs} ($CR + Ins_{acs}$), фібрил інсуліну (Ins_{acs}) та диференційний спектр конго червоного. Концентрації білка та CR склали 33 та 40 мкМ, відповідно (праворуч)

фрагментів апо-А-I у 10 мМ Tris буфері (150 мМ NaCl, 0.01 % NaN₃, рН 7.4), вимірювали на спектрофотометрі Varian Cary100Bio (Varian Instruments, Walnut Creek, CA, США) при кімнатній температурі. Спектрофотометричним методом визначали концентрації зондів та білків. Коефіцієнти екстинкції бензантронових зондів ε (М⁻¹см⁻¹) та максимуми їх поглинання λ_{abs} (нм) в етанолі наведені у таблиці 2.2. Коефіцієнти екстинкції ε (М⁻¹см⁻¹) та максимуми поглинання λ_{abs} (нм) похідних ThT у натрій-фосфатному буфері (5 мМ, рН 7.4) та сквараїнів у DMSO наведені у таблиці 2.3.

Для ThT, Rh101, Cy5, CR, 1,8-АНС, NR використовували такі коефіцієнти екстинкції: $\varepsilon_{412}^{буфер} = 23800$ [135], $\varepsilon_{576}^{етанол} = 9.5 \times 10^4$ [234], $\varepsilon_{649}^{етанол} = 2.5 \times 10^5$, $\varepsilon_{498}^{етанол} = 4.7 \times 10^4$ [235], $\varepsilon_{372}^{етанол} = 7800$ [236], $\varepsilon_{552}^{DMSO} = 19600$ М⁻¹см⁻¹ [237], відповідно. Для лізоциму та інсуліну – $\varepsilon_{280}^{буфер} = 3.6 \times 10^4$ та $\varepsilon_{280}^{буфер} = 5800$ М⁻¹см⁻¹ [238], відповідно. Для фрагментів 1-83 апо-А-I – $\varepsilon_{280} = 8480$ М⁻¹см⁻¹.

Для додаткового підтвердження амілоїдної природи агрегатів F_{acs} та Ins_{acs} вимірювали також диференційні спектри поглинання CR (рис. 2.5). Виявилося, що максимум диференційного спектра CR (рис. 2.5А) складав 542 нм, що співпадає з даними С. Годи, отриманими для фібрил лізоциму [6]. Також диференційний спектр CR у присутності Ins_{acs} мав максимум 542 нм, що узгоджується з даними В.Є. Кланка для фібрил інсуліну [116]. Такі результати свідчать про амілоїдну природу утворених агрегатів білків.

2.6. Флуоресцентні вимірювання

Вимірювання флуоресценції здійснювали на спектрофлуориметрах Varian Cary Eclipse (Varian Instruments, Walnut Creek, CA, США), LS-50B (Perkin-Elmer, Велика Британія) та CM-2203 (Solar, Білорусь), при фіксованій температурі та при постійному перемішування розчинів за допомогою магнітних мішалок. 1,8-АНС та NR збуджували у максимумах поглинання в етанолі та DMSO, відповідно. Бензантронові зонди та похідні ThT збуджували у максимумах їх поглинання в етанолі (таблиця 2.2). Збудження сквараїнів

проводили при менших довжинах хвиль, ніж максимуми їх поглинання, оскільки зонди мають низьке значення Стоксового зсуву. Зокрема, G1, G2, G4 збуджували на 610 нм, G6, G7 – на 590 нм, G5 – на 490 нм [239].

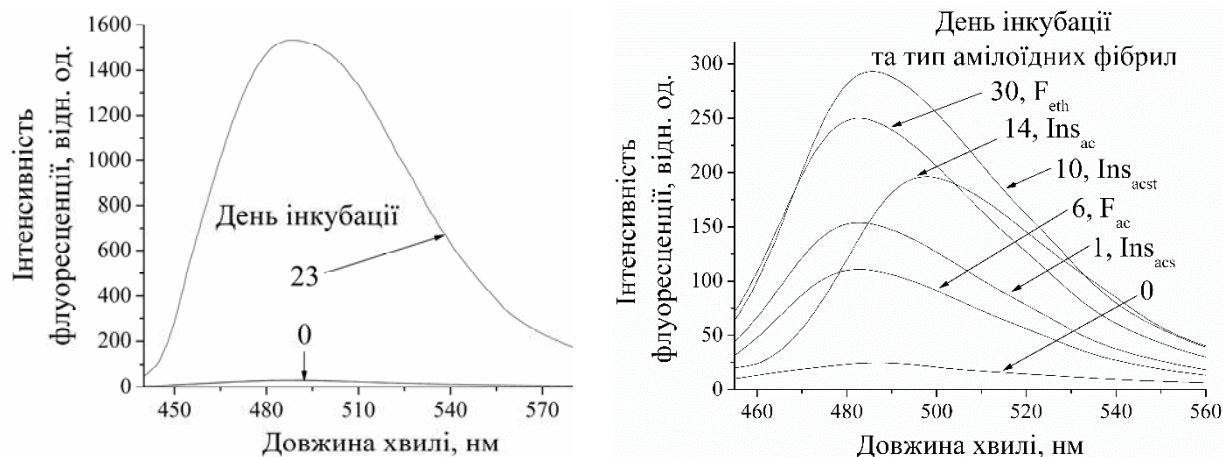


Рисунок 2.6. Спектри флуоресценції тіофлавіну Т у присутності лізоциму F_{acs} (ліворуч); фібрил лізоциму F_{ac} , F_{eth} та інсуліну Ins_{acs} , Ins_{acst} , Ins_{ac} (праворуч) в залежності від дня інкубації. Концентрації F_{acs} , F_{ac} , F_{eth} , Ins_{acs} , Ins_{acst} , Ins_{ac} становили 4,5; 7; 3,5; 1,8; 16,5; 17 мкМ, відповідно. Концентрація ThT – 15 мкМ

Вимірювання інтенсивності флуоресценції ThT було проведено для того, щоб довести утворення саме амілоїдних агрегатів білків під час інкубації.

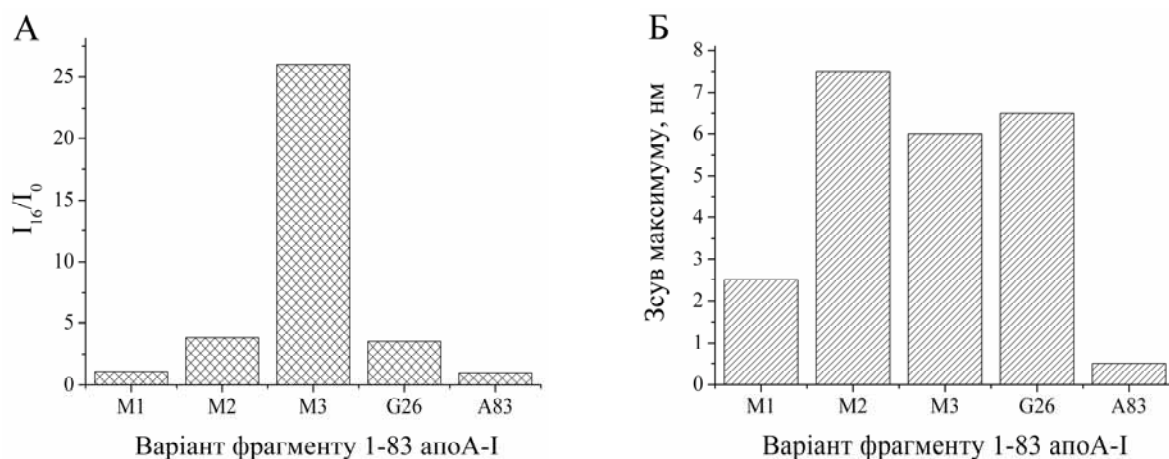


Рисунок 2.7. Зростання інтенсивності флуоресценції ThT на 16-й день інкубації варіантів фрагменту апо-А-I у порівнянні з контролем (А) та довгохвильові зсуви максимуму флуоресценції зонда на 16-й день інкубації пептиду відносно контролю (Б). Довжина хвилі випромінювання ThT – 480 нм. Концентрація білка – 5 мкМ, концентрація ThT – 6,6 мкМ

Зокрема, про наявність амілоїдних фібрил F_{acs} (Ins_{acs}) свідчить зростання інтенсивності флуоресценції ThT у присутності білка у 50 (6) разів у порівнянні з контролем (рис. 2.6) [144,147]. На рис. 2.6Б також показано наявність характеристичної флуоресценції ThT у присутності амілоїдних фібрил F_{ac} , F_{eth} , Ins_{acst} , Ins_{ac} . Для фрагментів апо-A-I, з яких формували амілоїдні фібрили за наведеною вище методикою, при вимірюванні флуоресценції ThT було виявлено, що ступінь фібрилізації білка найвищий для варіанта М3 (рис. 2.7).

2.6.1. Розрахунки параметрів зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами

Зв'язування лігандів з макромолекулами часто описують у термінах мономодальної моделі адсорбції Ленгмюра [100,147,240]. У цій моделі параметри зв'язування зонда з амілоїдними фібрилами можна отримати двома способами, що базуються на визначенні концентрації зв'язаного барвника при варіюванні концентрації зонда або білка [241]. З метою усунення взаємної кореляції параметрів моделі для досліджуваних зондів використовували два способи одночасно, тобто проводили флуориметричне титрування як зонда білком, так і білка зондом.

При аналізі зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами робиться припущення про пропорційність між відносним зростанням флуоресценції ΔI барвника (у максимумі його флуоресценції при зв'язуванні з амілоїдними фібрилами) та концентрацією зв'язаного зонда B_z :

$$\Delta I = I - I_0 = \alpha B_z, \quad (2.2)$$

де α – коефіцієнт пропорційності до різниці квантових виходів зонда у вільному та зв'язаному станах; I_0 та I – інтенсивності флуоресценції барвника у вільному та у зв'язаному станах.

У термінах мономодальної моделі адсорбції Ленгмюра константу асоціації (K_a) зонда з амілоїдними фібрилами можна представити у вигляді:

$$K_a = \frac{B_z}{(Z - B_z)(nP - B_z)} = \frac{B_z}{F_z(nP - B_z)}, \quad (2.3)$$

де n – стехіометрія зв'язування, F_z та Z – концентрація вільного зонда та загальна концентрація зонда, P – концентрація білка (nP – загальне число білкових сайтів зв'язування зонда).

Якщо розв'язати квадратне рівняння (2.3) відносно B_z (з урахуванням виразу (2.2)), отримаємо:

$$\Delta I = 0.5\alpha \left[Z + nP + 1/K_a - \sqrt{(Z + nP + 1/K_a)^2 - 4nPZ} \right] \quad (2.4)$$

Рівняння (2.4) використовували для апроксимації експериментальної залежності ΔI від P (при титруванні зонда білком, $Z = \text{const}$) у програмному пакеті Origin та для знаходження параметра α . На наступному етапі тим же рівнянням апроксимували залежність ΔI від Z (при титруванні білка зондом, $P = \text{const}$) для знаходження параметрів K_a та n (при фіксованому параметрі α , знайденому при першій підгонці). При використанні одного типу титрування – зонда білком, приблизні значення параметрів знаходили уже при апроксимації залежності ΔI від P . Такий підхід годиться при лінійній залежності $1/\Delta I$ від $1/P$ (подвійні обернені координати) що означає наявність тільки одного сайту зв'язування:

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{nPK_a Z} + \frac{1}{\alpha Z} \quad (2.5)$$

Точка перетину графіку (2.5) з віссю Y (за умови, що $nP \gg B_z$, тобто при високих концентраціях білка) дає величину $1/\alpha Z$, що дозволяє отримати оцінку параметра α графічним способом. З іншого боку, для знаходження параметра K_a використовували залежності $1/\Delta I$ від $1/Z$ (за умови, що $Z \gg B_z$, тобто

високих значеннях Z), де значення перетину прямої з віссю X дає значення параметра K_a [147,240]. Дійсно, рівняння:

$$\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{\alpha n P K_a Z} + \frac{1}{\alpha n P} \quad (2.6)$$

Параметр n знаходимо із перетину прямої (2.6) з віссю Y , беручи до уваги знайдене з рівняння (2.5) значення α : $1/n = \alpha P \cdot 1/\Delta I$ при $Z \gg B_z$. Графіки Скетчарда (залежності відношення B_z/F_z від B_z , а у нашому випадку: $\frac{\Delta I}{Z\alpha - \Delta I}$ від $\frac{\Delta I}{\alpha}$ (з урахуванням рівняння (2.2)) при титруванні білка зондом) деяких барвників мали нелінійний характер (вигнуті донизу), що свідчить про наявність більш ніж одного типу сайтів зв'язування зондів на білку [116,242]. У цьому випадку для розрахунку параметрів зв'язування використовували модифіковану модель Ленгмюра:

$$\Delta I = \alpha_1 B_{z1} + \alpha_2 B_{z2}, \quad (2.7)$$

де індекси 1,2 відповідають центрам зв'язування першого та другого типів. Параметри цієї моделі визначали за допомогою глобальної апроксимації трьох кривих зв'язування у середовищі Mathcad, отриманих за допомогою: титрування білка зондом та титрування зонда білком (при цьому брали дві концентрації зонда). Мінімізацію функції $f = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\Delta I_i^{\text{exp}}}{\Delta I_i^{\text{theor}}} - 1 \right)^2$ (де N – загальне число експериментальних точок) здійснювали для знаходження кращої підгонки теоретичних значень ($\Delta I_i^{\text{theor}}$) до експериментальних (ΔI_i^{exp}) [265]. Для того, щоб отримати коректні значення параметрів підгонки, використовували рівняння: $\alpha_1 n_1 P + \alpha_2 n_2 P \leq \Delta I_{\text{макс}}$, де $\Delta I_{\text{макс}}$ – максимальне зростання інтенсивності флуоресценції при повному насиченні сайтів зв'язування [199].

З використанням отриманих параметрів зв'язування (у випадку мономодальної моделі), розраховували додаткові параметри: I/I_0 – відносне зростання інтенсивності флуоресценції 0.5 мкМ зонда у присутності 50 мкМ нативного або фібрилярного білка; I/I_{nat} – зростання інтенсивності флуоресценції 0,5 мкМ зонда у присутності 50 мкМ фібрилярного білка відносно його флуоресценції у присутності нативного білка, або специфічність зонда до агрегатів білка. Зміну вільної енергії Гіббса ΔG розраховували за формулою [199]:

$$\Delta G = -RT \ln K_a, \quad (2.8)$$

де R – універсальна газова константа, T – температура (293 K).

Параметр ΓD розраховували, виходячи з рівнянь (2.2) та (2.4), – це концентрація білка, при якій інтенсивність флуоресценції зонда (0,5 мкМ) зростає у 2 рази, тобто $I/I_0 = 2$ (*). Виражаючи концентрацію білка через параметри зв'язування з урахуванням умови (*), отримуємо:

$$\Gamma D = \frac{1}{2} \frac{\kappa^2 - 2\kappa(Z + 1/K_a)}{2n(\kappa - 2Z)}, \quad (2.9)$$

де $\kappa = \frac{4Z\alpha_0}{\alpha}$, α_0 – флуоресценція 1 мкМ зонда.

2.6.2. Визначення квантового виходу флуоресцентних зондів

Квантові виходи флуоресцентних зондів було розраховано у вільному стані та у присутності амілоїдних фібрил, нативного білка або у натрій-фосфатному буфері (5 мМ, рН 7.4) за формулою:

$$Q = \frac{n_D^2}{n_S^2} \frac{Q_S (1 - 10^{-A_S}) S_D}{(1 - 10^{-A_D}) S_S}, \quad (2.10)$$

де Q_s – квантовий вихід стандарту (Rh101, $Q \sim 0.91$ у етанолі, для бензантронів похідних ThT та скварайну G5; зонд Cy5 – для скварайнових зондів, $Q \sim 0.28$ в етанолі); S_D та S_s – площі флуоресцентних спектрів зонда та стандарту, відповідно; A_D та A_s – поглинання зонда та стандарту на довжині хвилі збудження зонда, відповідно; n_D та n_s – показники заломлення амілоїдних фібрил ($\sim 1,5$) та буфера (етанола) ($\sim 1,33$ (1,6)), відповідно [243,244].

2.6.3. Дослідження часороздільної флуоресценції зондів

Для бензантронів зондів у DMF та у присутності амілоїдних фібрил F_{ac} вимірювали часороздільну флуоресценцію за допомогою спектрофлуориметра Photon Technology International (PTI), що мав у складі лазерну систему GL-302 Dye Laser (Канада). Азотний лазер цієї системи дає імпульси на 337 нм. Для збудження бензантронів на 421 нм використовували розчин лазерного зонда LC 4230 (POROP) (Kodak, США) у суміші толуолу з етанолом [244]. Флуоресценцію реєстрували у максимумах флуоресценції вільного або зв'язаного зонда. Функцію відгуку приладу знаходили на довжині хвилі збудження за допомогою розсіювача колоїдного диоксиду кремнію (Ludox). Для оптимізації відношення «сигнал-шум», брали до уваги 3500 фотонів у піковому каналі. Для отримання кривих кінцевого профілю затухання використовували усереднене значення 6 послідовних вимірювань. Отримані дані підганяли моно- (для DMF) та двооекспоненційними (для амілоїдних фібрил) функціями, використовуючи середовище Felix-GX [92]:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t / \tau_i), \quad (2.11)$$

де τ_i та α_i – часи життя та передекспоненційні коефіцієнти; n – число компонентів, що вносять внесок в усереднений час життя: $i = 1$ або 2 для моно- чи двооекспоненційного затухання, відповідно.

Якість підгонки характеризували за допомогою хі-квадрату (χ^2), зважених залишків та автокореляційної функції зважених залишків [245]. Підгонка вважалась задовільною при значеннях χ^2 від 0.8 до 1.2, при цьому графіки зважених залишків та автокореляційних функцій були розкидані випадковим чином відносно нуля [92]. Внесок (f_i) кожного компонента у стаціонарну флуоресценцію зонда у присутності амілоїдних фібрил розраховували як [92]:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_{j=1}^n \alpha_j \tau_j} \quad (2.12)$$

Усереднений час життя ($\langle \tau \rangle$) зондів у присутності F_{ac} розраховували за рівнянням:

$$\langle \tau \rangle = f_1 \tau_1 + f_2 \tau_2 \quad (2.13)$$

2.6.4. Дослідження індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ)

Індуктивно-резонансний перенос енергії (ІРПЕ) успішно використовується для вивчення структурних трансформацій білка завдяки його високій чутливості до відстані між донором та акцептором [92]. Зокрема, ІРПЕ між внутрішнім (триптофан) та зовнішніми флуорофорами визначали для селективного детектування агрегатів α -синуклеїну [246], оцінки ступеня фібрилізації $A\beta$ -пептиду [59], олігомерізації [199] та морфологічних відмінностей у структурі фібрил [247], міжмолекулярного упорядкування фібрил транстиретину [192], тощо.

Ефективність (E) ІРПЕ оцінювали методом гасіння флуоресценції донора. Спектри флуоресценції ThT (донор) у присутності бензантронів (акцептори) було скориговано на ефекти розведення та внутрішнього фільтру, а розрахунки ефективності переносу здійснювали у точці, де інтенсивність

флуоресценції ThT досягла мінімального значення. Ефективність ІРПЕ E розраховували за формулою:

$$E = \frac{F_{DA}}{F_D}, \quad (2.14)$$

де F_{DA} та F_D – флуоресценція донора у присутності та за відсутності акцептора, відповідно.

Розрахунки радіусу Фьорстера (відстань між донором та акцептором, за якої ефективність переносу енергії складає 50%) та граничних значень орієнтаційного фактору (κ^2) здійснювалися для того, щоб оцінити діапазон можливих відстаней (R_{\min}, R_{\max}) між ThT та бензантронами [92]. Аналогічно було зроблено і для інших донорно-акцепторних пар. Радіус Фьорстера розраховували як [92]:

$$R_0 = 0.211(\kappa^2 n^4 Q_D J(\lambda))^{1/6}, \quad (2.15)$$

де κ^2 – орієнтаційний фактор ($\kappa^2=0.67$ для донорів та акцепторів, які швидко обертаються у просторі, незалежно один від одного); Q_D – квантовий вихід донора (для фібрил лізоциму, інсуліну, фрагменту апо-А-I квантовий вихід ThT складав 0,44, 0,83 та 0,63, відповідно [154,199]; для пари АВМ зі скварайнами квантовий вихід АВМ становив 0,35); n – показник заломлення середовища (1,33); $J(\lambda)$ – інтеграл перекриття між нормованими спектрами флуоресценції донора та поглинання акцептора:

Верхню та нижню межі κ^2 оцінювали за наступними формулами [248]:

$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left[1 - \frac{(d_D^x + d_A^x)}{2} \right], \quad \kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D^x + d_A^x + 3d_D^x d_A^x), \quad (2.16)$$

де $d_i^x = (r_i / r_0)^{1/2}$ – деполяризаційний фактор завдяки сегментальним рухам донора (d_D^x) та акцептора (d_A^x), але не загальній обертальній дифузії білка; значення r_0 та r_i – це фундаментальне значення анізотропії флуоресценції зонда ($r_0 \approx 0.4$) та вимірюваної анізотропії стаціонарної флуоресценції (для бензантронів $r_i \approx 0.2$).

Нарешті, відстань r між донором та акцептором оцінювали за формулою (брали модель для одиничної донорно-акцепторної пари на фіксованій відстані, оскільки зонди мали високі константи асоціації з білком):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.17)$$

2.7. Квантово-хімічні розрахунки

У даній роботі розраховували квантово-хімічні дескриптори різного типу: міжмолекулярні ($CLogP$, P); просторової структури (CA , CV , L , W , H , φ) та електронної структури ($\sum Q(N)$, $\sum Q(C)$, E_{HOMO} , E_{LUMO} , μ_g , μ_e , q_g , q_e , E_g , E_e , ΔE_e , f) [249-253]. Дескриптори CA , CV (площа та об'єм, доступні розчиннику, відповідно); E_{HOMO} , E_{LUMO} (енергія вищої зайнятої та нижчої вільної орбіталей, відповідно); L , W , H (довжина, ширина, висота молекули, відповідно); P (поляризованість молекули при силі електричного поля 0 eV); $\sum Q(N)$, $\sum Q(C)$ (сума зарядів на атомах азоту та вуглецю, відповідно) були розраховані у програмному пакеті MOPAC напівемпіричним методом PM6 (має в основі апроксимації метод NDDO, що дає кращу оцінку молекулярних властивостей, ніж MNDO, при цьому не потребує багато комп'ютерних ресурсів) [254]. Дескриптори μ_g , μ_e (дипольні моменти основного та збудженого станів, відповідно); E_g , E_e (енергія основного та збудженого станів, відповідно); f (сила осцилятора); ΔE_e (енергія вертикального переходу $S_0 \rightarrow S_1^{abs}$, з основного до нерелаксованого найнижчого збудженого стану, сформованого одразу після поглинання фотону); φ (двогранний кут між донором та акцептором молекули зонда); q_g , q_e (сумарний заряд на атомах донора в основному та збудженому

станах, відповідно) були розраховані у програмному пакеті WinGamess [255] з використанням базису 6-31G (d,p), а також теорії функціоналу густини (DFT або TDDFT для основного та збудженого станів, відповідно) та функціоналу B3LYP (що дають більш точні значення зарядів та дипольних моментів) [8,256-258]. Геометрію сквараїнів для розрахунків у WinGamess оптимізували неемпіричним методом 6-31G. Для бензантронних зондів та похідних ThT при оптимізації геометрії за допомогою AM1 використовували додаткові 2 поляризаційні функції на атомах водню та важких атомах, та дифузійну функцію на важких атомах. Метод AM1 придатний для розрахунків геометричних характеристик та залежності потенційної енергії від торсійних кутів, а також потребує мало комп'ютерних ресурсів [8,259]. Зокрема, він дозволяє точно розрахувати електронно-просторову будову гетероциклічних молекул, що містять атоми N, O та S. Властивості основного та збудженого стану усіх зондів розраховували у базисі 6-31G(d,p) (з використанням теорії функціоналу густини DFT або TDDFT для основного та збудженого станів, відповідно, та функціоналу B3LYP), використовуючи геометрію основного стану. Для стану S_1^{abs} похідних ThT дипольні моменти та заряди на атомах розраховували за допомогою методу CIS/6-31G(d,p) [260,261], хоча енергії збудженого стану та інші властивості кумаринів та різних органічних сполук, отримані за допомогою TDDFT, були більш надійними [262,263]. Усі розрахунки здійснювали у газовій фазі для основного (S_0) та не релаксованого збудженого (S_1^{abs}) станів флуорофорів.

Логарифм коефіцієнту розподілу октанол-вода ($CLogP$) розраховували для бензантронів за допомогою програмного пакету ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/>) найкращими методами для кожної групи зондів, показаними у роботі О.А. Житняківської (KOWWIN – для аміно-, XLOGP3 – для амідіно- та ALOGPs – для бромобензантронів) [264]. Для сквараїнів був обраний атомний метод MLOGP, оскільки отримані теоретичні значення $CLogP$ для цих сполук були подібні до експериментальних значень коефіцієнтів розподілу сквараїну SQ-1 між водною та ліпідною фазами [209].

2.8. Методи комп'ютерного моделювання та обробки даних

Обробку експериментальних даних і чисельне інтегрування та моделювання здійснювали у середовищі MathCad 2001 (MathSoft Inc., США). Обробку та графічну ілюстрацію отриманих даних здійснювали у програмному пакеті OriginPro 7.5.

2.9. Висновки

1. Для підтвердження амілоїдної природи агрегатів білків, отриманих *in vitro*, використовували низку методів: ТЕМ, круговий дихроїзм, вимірювання спектрів поглинання CR та спектрів флуоресценції ThT.

2. У більшості експериментів досліджували чутливість нових зондів до амілоїдних фібрил лізоциму, отриманих методом кислотної денатурації та шейкінгу.

3. Основним методом дослідження була флуоресцентна спектроскопія.

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ НОВИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ З АМІЛОЇДНИМИ ФІБРИЛАМИ

3.1. Визначення параметрів зв'язування за допомогою флуоресцентного титрування

3.1.1. Бензантронові зонди та фібрили лізоциму, отримані за умов кислотної денатурації та шейкінгу

На першому етапі роботи визначали параметри зв'язування та квантовий вихід бензантронових зондів, ThT та CR у фібрилах лізоциму F_{acs} (метод приготування фібрил наведено у розділі 2.2). Низьке значення рН та висока температура призводять до високого виходу агрегатів білка, а також до майже повної відсутності аморфних структур [194,265]. Крім того, шейкінг значно збільшує імовірність формування ядер нуклеації, тобто знижує лаг-період росту фібрил [193,195]. Про формування амілоїдних фібрил свідчать результати ТЕМ, зростання інтенсивності флуоресценції ThT, типові відмінності у спектрах кругового дихроїзму і поглинання конго червоного для нативного і фібрилярного білка (розділ 2) [95].

Типові спектри флуоресценції зондів, отримані при подвійному флуориметричному титруванні (зонда білком та білка зондом), наведені на рис. 3.1. Для деяких флуорофорів, що показали слабке зростання інтенсивності флуоресценції при титруванні білком (P10, AM17) або високий квантовий вихід у вільному стані (P14, AM21, AM19, FA), а також при вивченні зв'язування флуорофорів з нативним лізоцимом, не здійснювали титрування білка зондом. Спектри флуоресценції бензантронових зондів, ThT та NR у точці насичення фібрилами та нативним лізоцимом наведені на рис. 3.2 та 3.3, відповідно. Зростання квантового виходу зондів у присутності амілоїдних фібрил свідчить про зниження полярності мікрооточення флуорофорів (квантовий вихід зондів

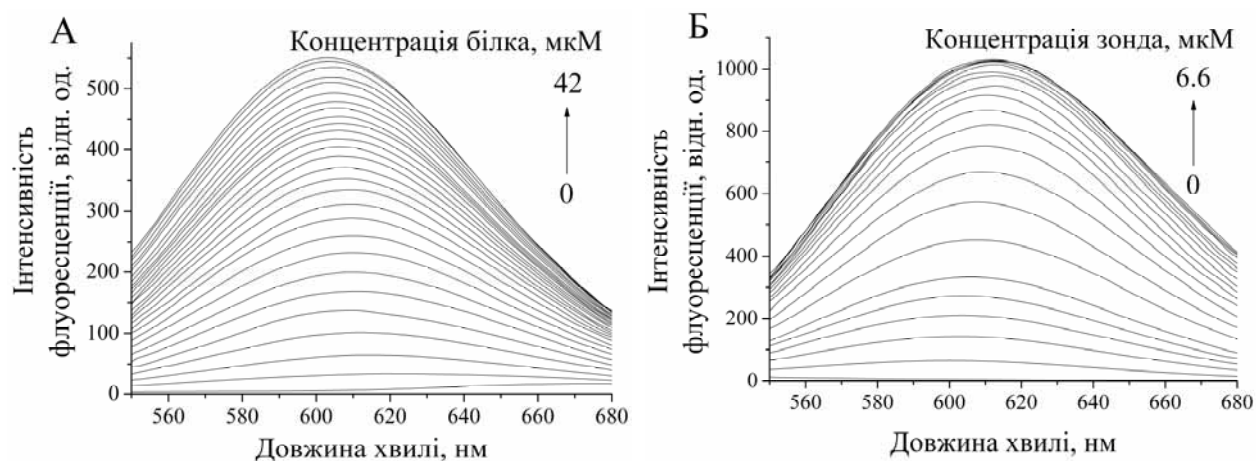


Рисунок 3.1. Спектри флуоресценції АВМ у фібрилах F_{acs} при титруванні зонда білком (А) та титруванні білка зондом (Б). Концентрації зонда та білка: 0,5 (А) та 18 мкМ, відповідно

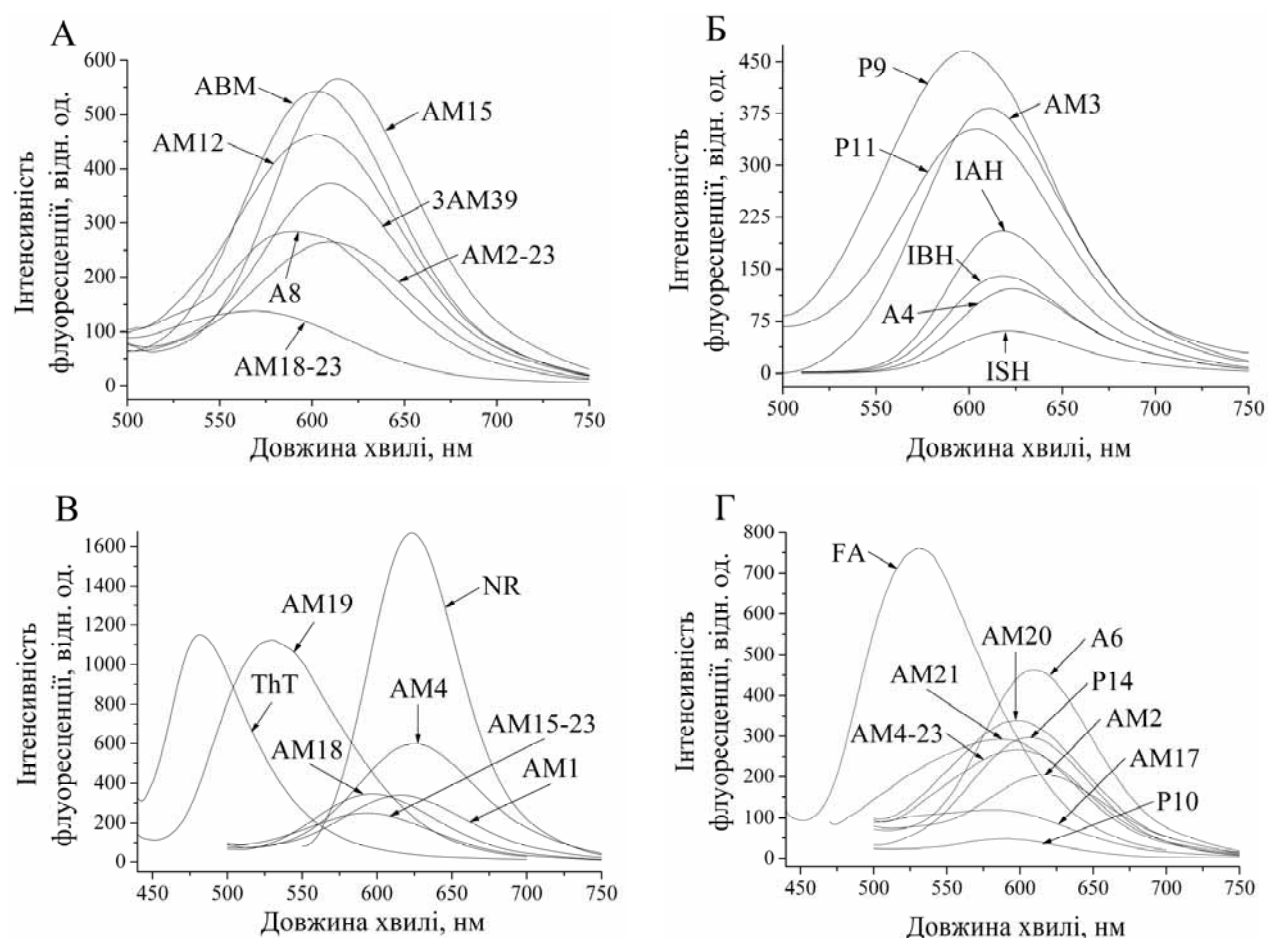


Рисунок 3.2. Спектри флуоресценції бензантронових зондів у фібрилах F_{acs} . Концентрація зондів становила 0,5 мкМ. Концентрації зондів ThT та Нільського Червоного (NR) були 0,2 та 0,7 мкМ, відповідно. Концентрації білка: 42, 48, 42, 40, 48, 46, 46, 40, 28, 28, 44, 42, 40, 52, 38, 54, 50, 59, 44, 52, 40, 48, 50, 52, 44, 50, 33, 22, 37, 30 мкМ для АВМ, AM18-23, AM2-23, A8, AM12, 3AM39, AM15, IAH, IBH, ISH, AM3, P9, P11, A4, AM18, AM4, AM1, ThT, NR, AM15-23, AM19, AM20, AM2, AM4-23, P14, A6, AM21, P10, AM17, FA, відповідно

у бензолі вищий, ніж у ДМФ) [9,137]. Така ж поведінка спостерігалася для АВМ при зв'язуванні з мембранами лімфоцитів та людським сироватковим альбуміном [10,261] (рис. 3.2).

Наявність короткохвильових зсувів максимумів флуоресценції бензантронів ($\lambda_{em}^{F_{acs}}$) відносно максимумів вільного зонда (λ_0) (таблиці 3.1 та 3.2) означає зниження полярності оточення зондів у фібрилах білка [8,9]. Модулі цих зсувів були ~20–100 нм у присутності білкових фібрил для більшості зондів, хоча А6, АМ18, АМ18-23, Р10, Р14, АМ17, АМ4-23, АМ15-23 і ThТ показали нижчу чутливість максимумів до зміни полярності оточення (зсув максимуму не перевищував 18 нм). Зсув максимуму флуоресценції зв'язаного 1,8-АНС відносно вільного складав 53 нм (з 523 до 470 нм) (рис. 3.3А), а інтенсивність флуоресценції зросла у 63 рази (рис. 3.3Б), що можна пояснити наявністю областей з високою гідрофобністю поблизу поверхні фібрили, оскільки аморфні агрегати білків не утворюються за умов шейкінгу та високої температури [232,267-269].

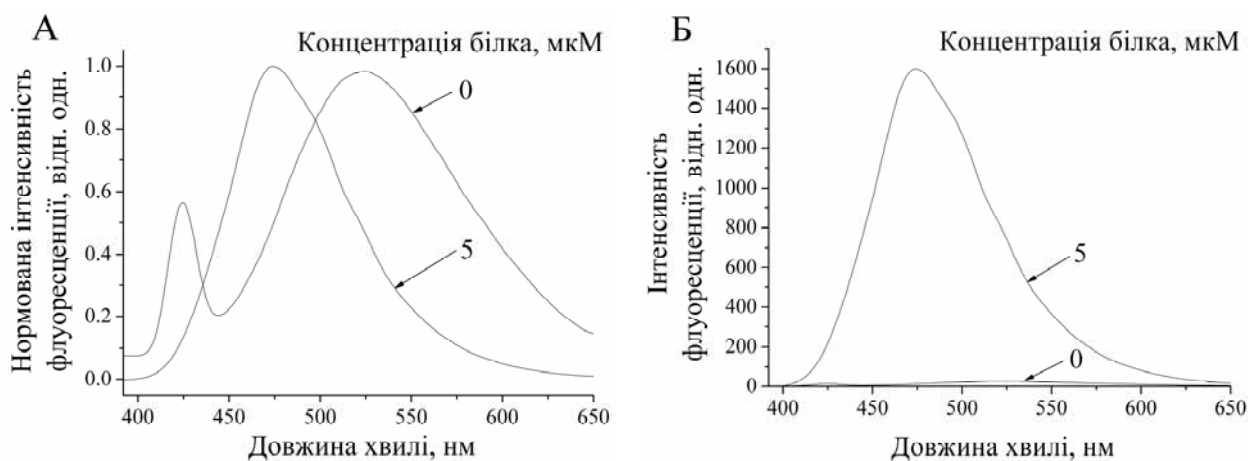


Рисунок 3.3. Спектри флуоресценції 1,8-АНС (5 мкМ) у фібрилах F_{acs} (5 мкМ)

При титруванні зондів нативним лізоцимом вихід кривої зв'язування на плато досягалось для деяких зондів при таких самих концентраціях, що і для фібрил, а також спостерігались короткохвильові зсуви максимумів (таблиця 3.1, λ_{em}^{LzN}). Однак, інтенсивність флуоресценції зростала значно менше (рис. 3.4). Зокрема, квантовий вихід флуоресценції більшості зондів у присутності F_{acs} (Q)

Таблиця 3.1

Характеристики зв'язування бензантронових зондів з нативним лізоцимом

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	α , мкМ ⁻¹	I/I_0	λ_0 , нм	λ_{em}^{LZN} , нм	Q_0	Q_n	Q_n / Q_0	ΔG , кДж/ моль	$ГД$, мкМ
A6	3,5	0,11	283±28	4,6	620	600	0,018	0,07	3,9	-37	0,8
AM1	0,1	0,52	-10±2	0	637	609	0,005	0,002	0,4	-28	-
AM2	0,33	0,23	1,9±0,2	1	679	655	0,003	0,004	1,3	-31	-
AM3	-	-	-	1	660	653	0,013	0	0,3	-	-
AM4	0,36	0,027	44±4	2,2	706	594	0,002	0,009	4,5	-31	14
AM12	0,33	0,68	5,9±0,6	1,2	665	596	0,009	0,007	0,8	-31	-
AM15	0,02	6	30±4	2,2	665	609	0,005	0,009	1,8	-24	17
AM18	0,3	0,03	- 182±18	0	615	575	0,004	0,001	0,3	-31	-
AM2-23	0,37	0,25	37±4	3,8	707	594	0,004	0,015	3,8	-31	2,3
AM21	8,5	0,003	-12±2	1	606	560	0,03	0,037	1,2	-39	-
P9	0,13	0,7	-6±0,36	0,9	574	574	0,019	0,075	3,9	-28	-
AM18-23	-	-	-	1	644	636	0,004	0	0,3	-	-
A8	0,17	0,09	-15±2	0,8	573	573	0,015	0,024	1,6	-29	-
P10	0,024	38	-56±6	0	589	661	0,007	0,021	3	-25	-
P11	9	0,05	35±4	3,2	572	573	0,013	0,013	1	-39	28
P14	22	0,1	127±12	3	603	576	0,022	0,043	2	-41	0,7
A4	0,09	0,07	37±4	3	649	621	0,0008	0,003	3,8	-29	8
IAH	0,002	0,057	193±20	1,6	628	600	0,002	0,061	31	-19	65
IBH	0,001	0,1	40±4	1	665	616	0,001	0,042	42	-17	476
ISH	0,001	0,27	39±4	1,1	667	626	0,001	0,034	34	-17	160
AM19	0,003	9,9	- 408±40	0,7	580	593	0,118	0,043	0,4	-20	-
FA	50	0,22	128±12	1,1	664	655	0,085	0,098	1,2	-43	1
ThT	0,23	0,029	68±6	2,4	489	487	0,001	0,007	7	-30	16
NR	-	-	-	-	656	-	0,004	-	-	-	-
ABM	4,9	0,54	56±6	6,4	671	564	0,008	0,015	1,9	-36	0,07
AM17	2,2	0,87	6,6±0,6	1,5	673	597	0,008	0,005	0,6	-20	0,3
3AM39	0,13	2	13±2	1,4	644	643	0,009	0,013	1,4	-43	-
AM4-23	30	0,06	89±8	5	605	591	0,007	0,017	2,4	-39	0,6
AM20	0,16	1,3	45±4	1,6	645	606	0,007	0,026	3,7	-25	4,6
AM15-23	0,87	0,03	25±2	1,8	615	650	0,004	0,007	1,8	-41	91

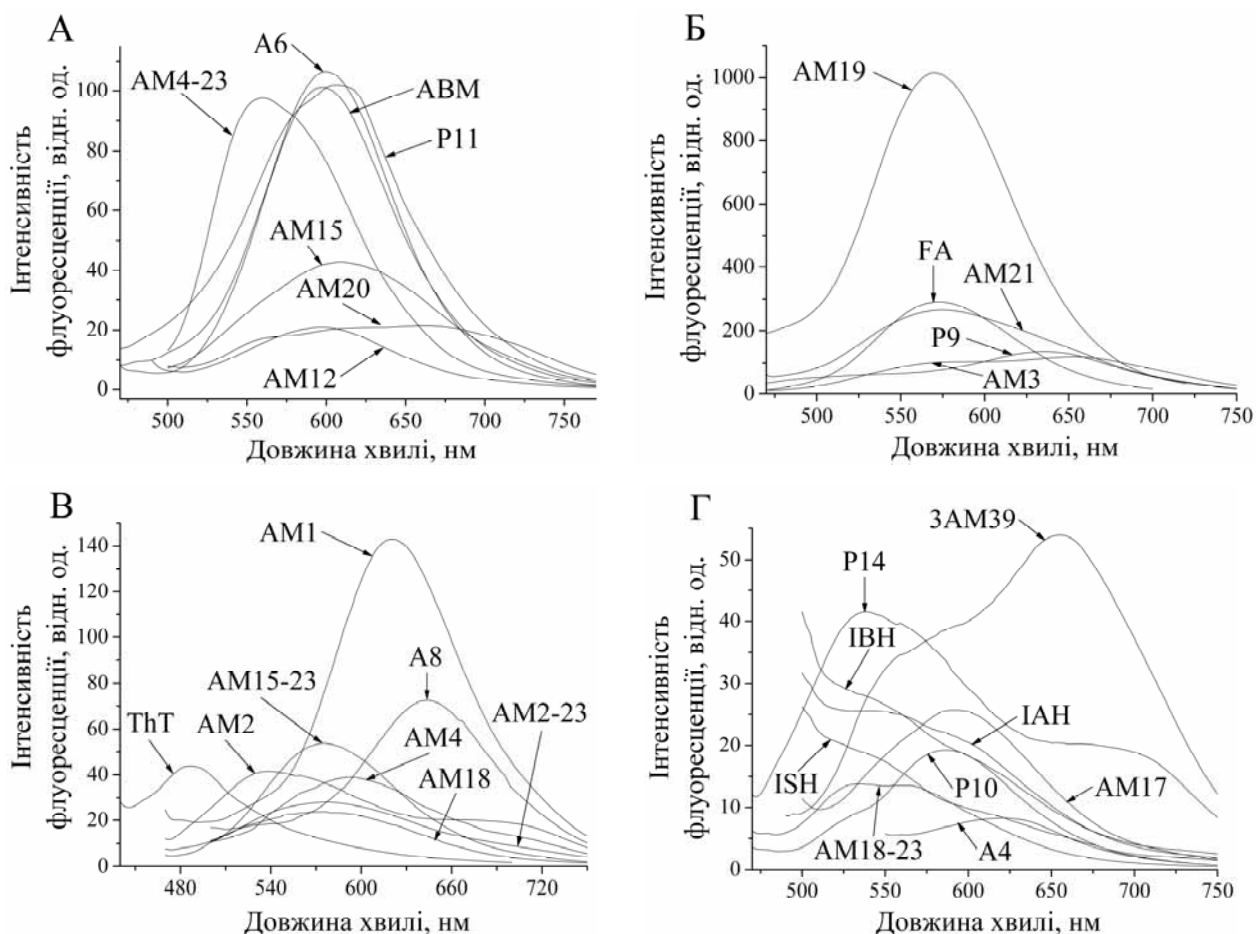


Рисунок 3.4. Спектри флуоресценції зондів у нативному лізоцимі. Концентрації зондів: 0,9, 0,7, 0,3, 2, 0,9, 2, 0,7, 1,6, 0,8, 3, 0,6, 1,9, 0,4, 2, 2, 0,4, 0,8, 1,7, 0,6, 2, 1,2, 1,8, 3,2, 0,3, 0,2, 0,3, 1,6, 1, 0,5 мкМ для ABM, AM15, A6, P11, AM4-23, AM20, AM12, AM1, IAH, IBH, ISH, AM3, A4, AM21, AM19, AM18, ThT, AM15-23, AM2-23, AM4, A8, P9, AM2, P14, P10, FA, 3AM39, AM17, AM18-23, відповідно. Концентрації білка: 19, 44, 52, 63, 29, 35, 67, 203, 1113, 1069, 65, 98, 1368, 112, 1665, 151, 125, 52, 114, 134, 134, 67, 54, 31, 18, 51, 15, 18, 18 мкМ, відповідно

був на порядок вищий, ніж у нативному лізоцимі (таблиця 3.2, Q/Q_n). Ці результати свідчать про більшу жорсткість сайтів зв'язування барвників у фібрилах лізоциму (що призводить до посилення стеричних взаємодій із зондом), у порівнянні з нативним білком, оскільки полярність оточення змінювалась неоднозначно. Зокрема, для зондів A6, AM1, AM4, AM12, AM15, AM18, AM2-23, AM21, P9, A8, P11, P14, IAH, ABM, AM4-23 максимуми флуоресценції були зсунуті у довгохвильову область у фібрилах відносно

Таблиця 3.2

Характеристики зв'язування бензантронових зондів з фібрилами лізоциму F_{acs}

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	α , мкМ ⁻¹	I/I_0	I/I_n	$\lambda_{em}^{F_{acs}}$, нм	Q	Q/Q_0	Q/Q_n	ΔG , кДж/ моль	ΓD , мкМ
A6	0,4	0,07	1247±125	9	2,3	612	0,23	18	5	-31	1,5
AM1	0,5	0,05	677±68	13	∞	617	0,15	31	63	-32	1
AM2	0,2	0,12	381±38	36	16,4	616	0,16	50	39	-30	0,3
AM3	0,25	0,13	875±88	14	14	610	0,18	14	43	-30	0,8
AM4	0,63	0,02	1150±115	44	17	624	0,33	178	38	-33	0,3
AM12	0,62	0,05	1222±122	29	26	604	0,34	38	51	-33	0,4
AM15	1	0,04	1546±155	41	21	615	0,17	34	19	-34	0,2
AM18	5,6	0,12	718±72	23	∞	597	0,08	19	62	-36	0,1
AM2-23	0,47	0,06	623±62	33	9	610	0,22	59	15	-32	0,3
AM21	5	0,04	523±52	4	4,3	587	0,19	6	5	-38	1,2
P9	0,53	0,07	936±94	13	8	599	0,34	18	15	-32	0,8
AM18-23	0,20	0,05	785±79	22	22	562	0,17	42	125	-30	0,7
A8	0,08	0,16	636±64	8	10	598	0,47	32	20	-28	2,2
P10	0,8	0,5	75±8	3	∞	590	0,013	2	0,6	-33	1,1
P11	0,14	0,13	837±84	13	9	604	0,37	28	29	-29	1,2
P14	1,6	0,04	794±79	8	3,5	605	0,17	8	4	-35	1,0
A4	0,46	0,06	978±98	161	42	614	0,04	53	13	-32	0,07
IAH	0,2	0,33	492±49	135	132	602	0,2	121	3,4	-30	0,04
IBH	0,33	0,43	386±39	98	81	595	0,1	66	2,3	-31	0,03
ISH	0,96	0,4	158±16	49	37	600	0,03	21	0,8	-34	0,03
AM19	414	0,01	1441±144	2,7	4	530	0,22	2	5	-48	2,8
FA	446	0,01	1000±100	2,6	1,2	531	0,19	2	2	-49	3,1
ThT	0,51	0,02	7439±744	99	82	482	0,55	646	126	-32	0,16
NR	9,8	0,04	2487±249	29	-	623	0,063	16	12	-39	0,09
ABM	0,93	0,06	1200±120	75	13	603	0,35	42	23	-34	0,1
AM17	16	0,02	203±20	4	13	579	0,035	4	7	-40	1,6
3AM39	0,61	0,07	813±81	27	14	611	0,23	26	18	-32	0,3
AM4-23	0,43	0,05	805±81	11	4	597	0,22	31	13	-32	1,3
AM20	0,42	0,04	755±76	12	3,4	597	0,36	49	14	-32	1,3
AM15-23	0,87	0,04	923±92	28	20	593	0,12	31	18	-33	0,4

нативного білка (перша група), а для решти зондів (друга група) був характерний зсув максимуму в короткохвильову область. Цікаво, що для АВМ у присутності нативного людського сироваткового альбуміну пацієнтів-чорнобильців спостерігалися значення максимумів флуоресценції в області 604-630 нм, причому нижня межа цього діапазону відповідає максимуму у присутності F_{acs} , тобто полярності сайтів зв'язування фібрил та нативного білка можуть бути близькими [266]. Можливо, перша група зондів локалізується ближче до поверхні нативного лізоциму, а друга – зв'язується з гідрофобними порожнинами білка (як, наприклад, 1,8-АНС може локалізуватися у гідрофобних порожнинах антагоністу рецептора інтерлейкіну-1) [236].

Таким чином, у присутності F_{acs} зонди виявилися чутливими до в'язкості мікрооточення, що впливає на макроскопічні характеристики амілоїдних фібрил. Зокрема, значення *модуля еластичності* фібрил залежить від гідрофобних зв'язків між боковими залишками амінокислот сусідніх β -листів, і для амілоїдних фібрил лізоциму $\sim 0,14\text{--}14$ ГПа [270]. Цікаво, що найбільший модуль еластичності мають фібрили коротких поліпептидів (вони більш жорсткі), наприклад, А β -пептиду, транстиретину, а також фрагментів білків у порівнянні з фібрилами цих білків, через можливі стеричні перешкоди при пакуванні довгого поліпептидного ланцюга у крос-бета структуру. З огляду на цей факт, еластичність агрегатів лізоциму вища, ніж В-ланцюгу інсуліну. *Жорсткість* фібрил (Модуль Юнга, або максимальний стрес уздовж осі, що вони можуть витримати без руйнування) зумовлена, в основному, сильними водневими зв'язками остовів поліпептидних ланцюгів, характерних для крос- β структури [81]. Наприклад, *жорсткість* фібрил інсуліну складає 3.3 ГПа (подібно до шовку), а *сила* – 0,6 ГПа (подібно до сталі) [85]. *Жорсткість згинання* (*персистентна довжина*) залежить також від кількості протофіламентів у фібрилі та має більше значення для фібрил інсуліну: $\sim 9,1 \cdot 10^{26}$ Н·м² (~ 22 мкм [270]), ніж для фібрил лізоциму: $\sim 4 \cdot 10^{26}$ Н·м² ($\sim 8,9$ мкм [190,271]), отриманих при схожих умовах (10 мг/мл білка, рН 2, 60–70 °С, 14 днів, без шейкінгу) [85,271]. Це пояснюється тим, що фібрили інсуліну,

отримані при рН 2, високій температурі та за умов шейкінгу мали діаметр 10–50 нм та склалися з 2–6 протофіламентів [196,198]. Фібрили лізоциму, отримані за таких самих умов, мали діаметр 7–20 нм та склалися з 2–3 протофіламентів [38,271]. Жорсткість згинання фібрил лізоциму та інсуліну лежить посередині інтервалу можливих значень цього параметра (дуже гнучкі фібрили α -лактальбуміну мали жорсткість згинання $1,4 \cdot 10^{-28}$ Н·м², а жорсткість згинання транстиретину (105–115) – $1,3 \cdot 10^{-24}$ Н·м²) [270]. Вищезазначені властивості амілоїдних фібрил свідчать про високий рівень іммобілізації барвників у жолобках – потенційних сайтах локалізації зондів.

Зі спектрів флуоресценції отримано ізотерми зв'язування зондів з фібрилами лізоциму – залежності зростання інтенсивності флуоресценції у її максимумі (довжину хвилі максимуму брали у точці насичення зонда білком, або в останній точці титрування барвника фібрилами лізоциму) відносно контролю (вільний зонд) від концентрації білка/ зонда (рис. 3.5, 3.6). Такі криві апроксимували рівнянням Ленгмюра (розділ 2.6.1). Цікаво, що насичення ІАН, ІВН, ІШН, АМ21, АМ19 проходило лише мілімолярними концентраціями нативного білка, що свідчить про дуже низькі значення константи асоціації та стехіометрії зв'язування з лізоцимом (таблиця 3.1, рис. 3.7). До того ж, майже у половини зондів не спостерігалось флуоресцентної відповіді на присутність нативного білка (наприклад, АМ3 та АМ18-23, рис. 3.4Б, Г). Параметр α виявився на 1–2 порядки нижчий, ніж для зондів у присутності фібрилярного білка (таблиця 3.2). Нарешті, параметр α для АМ1, АМ18, АМ21, Р9, А8, Р10, АМ19 мав значення нижче нуля, що означає зниження інтенсивності флуоресценції зонда у присутності нативного лізоциму. Цікаво, що значення K_a для А6, А8, Р11, Р14, АВМ, АМ4-23 було у 2–60 разів вище у нативному білку, ніж у фібрилярному. Оскільки сайти зв'язування цих зондів менш полярні у нативному лізоцимі (судячи з положень максимумів флуоресценції зондів) – тобто параметр K_a виявився чутливим до полярності оточення. В той же час, значення K_a АМ1, АМ4, АМ12, АМ15, АМ18, АМ2-23, Р9, ІАН більш чутливі до в'язкості оточення, оскільки вони зростали у фібрилярному

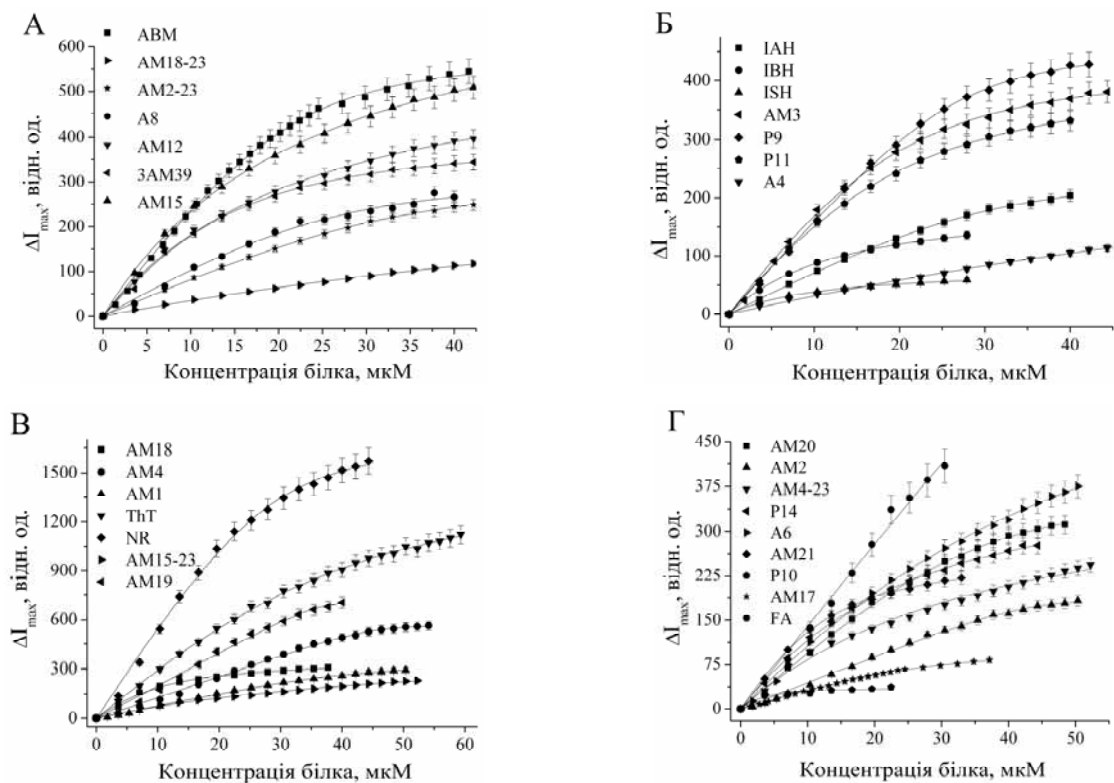


Рисунок 3.5. Ізотерми зв'язування зондів з фібрилами F_{acs} , отримані шляхом титрування зонда білком. Концентрації зондів: 0,5, 0,2, 0,7 мкМ для бензантронів, ThT, NR, відповідно

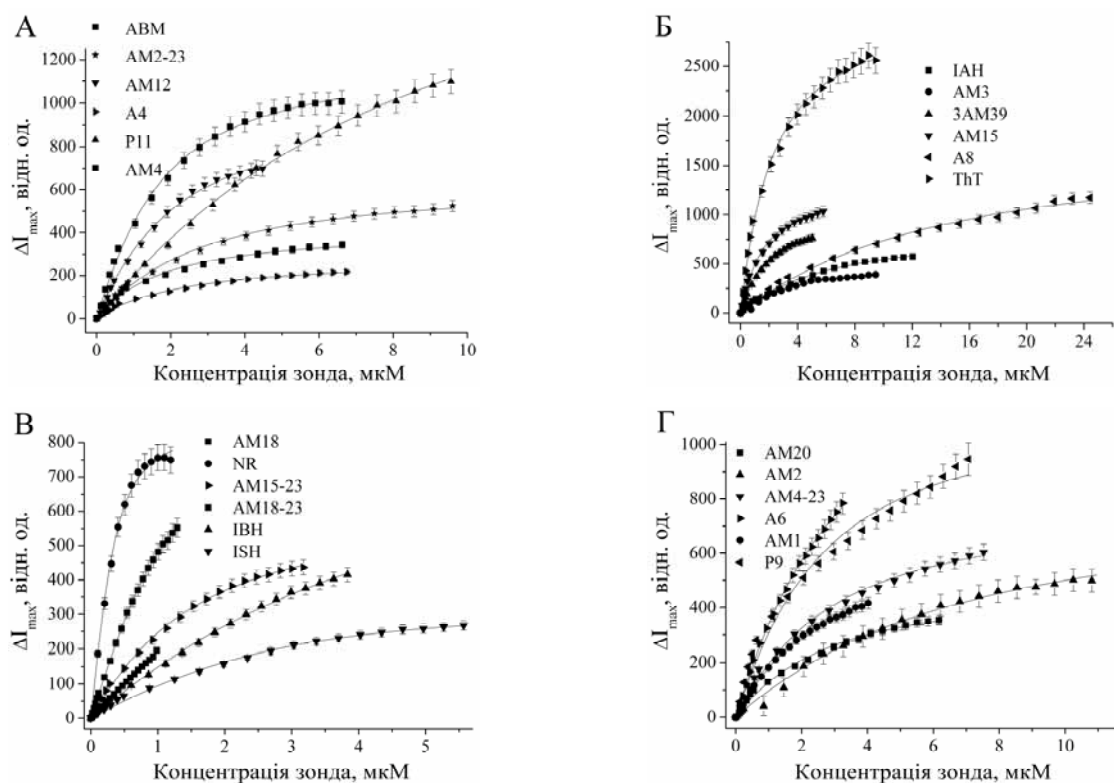


Рисунок 3.6. Ізотерми зв'язування зондів з фібрилами F_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом. Концентрації білка: 5 мкМ (A4, IAH, IBH, ISH, AM3), 9 мкМ (AM18, NR), 49 мкМ (AM18-23), 18 мкМ – (решта бензантронів)

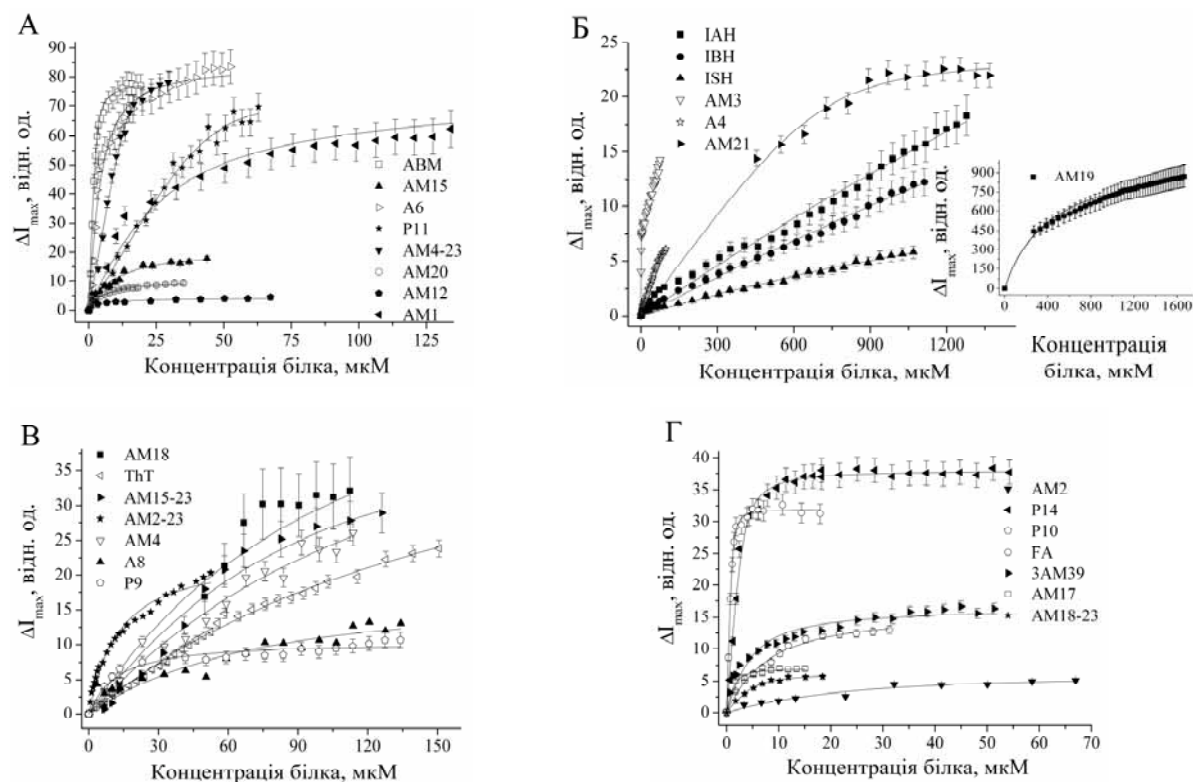


Рисунок 3.7. Ізотерми зв'язування зондів з нативним лізоцимом, отримані шляхом титрування зонда білком. Концентрації зондів: 0,9, 0,7, 0,3, 2, 0,9, 2, 0,7, 1,6, 0,8, 3, 0,6, 1,9, 0,4, 2, 2, 0,4, 0,8, 1,7, 0,6, 2, 1,2, 1,8, 3,2, 0,3, 0,2, 0,3, 1,6, 1, 0,5 мкМ для ABM, AM15, A6, P11, AM4-23, AM20, AM12, AM1, IAH, IBH, ISH, AM3, A4, AM21, AM19, AM18, ThT, AM15-23, AM2-23, AM4, A8, P9, AM2, P14, P10, FA, 3AM39, AM17, AM18-23, відповідно

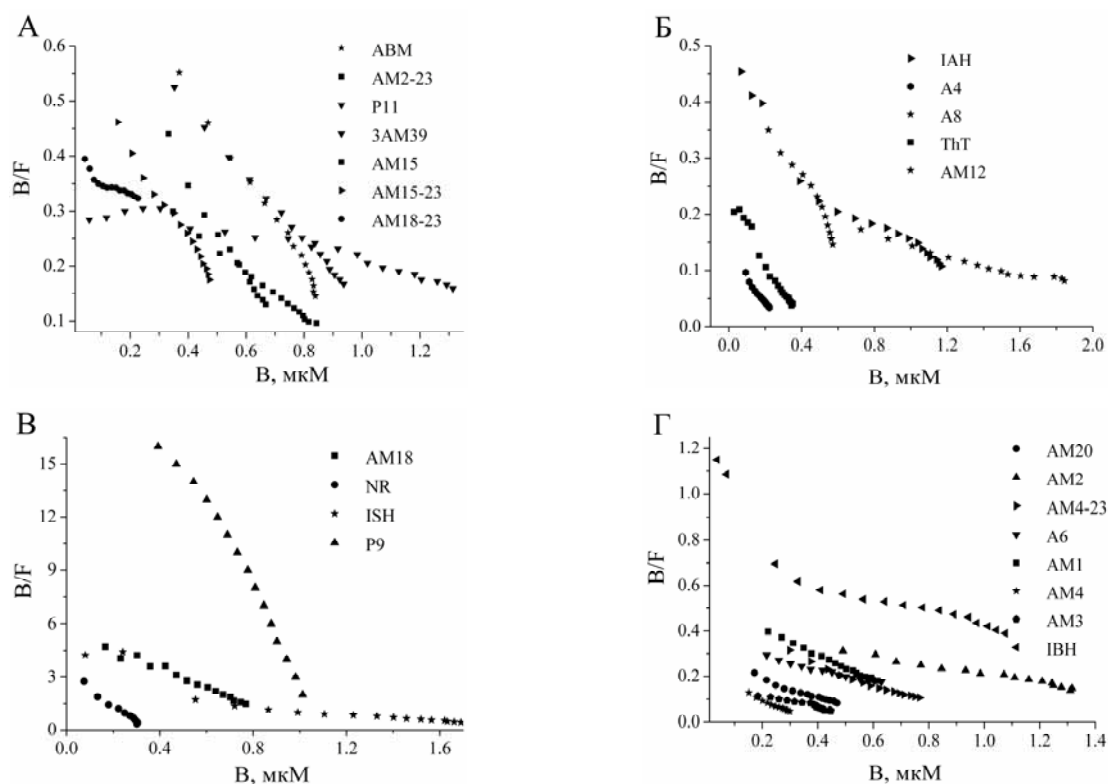


Рисунок 3.8. Графіки Скетчарда для зондів у присутності F_{acs}

оточенні, що має вищу полярність порівняно з нативним білком. Квантовий вихід зондів теж чутливий до в'язкості (та полярності), бо має більші значення у фібрилах для всіх зондів, крім P10, ISH. Значення n для нативного білка перевищували, як правило, значення для F_{acs} , що означає більшу доступність сайтів зв'язування для зондів. Однак, кореляція параметрів n та K_a для нативного лізоциму може призвести до помилок в інтерпретації їх чутливості до фізико-хімічних властивостей середовища. Також у таблицях 3.1 та 3.2 наведено значення вільної енергії Гіббса (ΔG) для асоціації барвників з лізоцимом, абсолютні значення яких становили 28–49 кДж/моль (для фібрилярного білка) або ж були нижчі, 17–43 кДж/моль (для нативного білка). Параметр $ГД$ (границя детектування, розділ 2.6.1) у випадку фібрил становив від 0.03 (IBH, ISH) до 3.1 (FA) мкМ, а у випадку нативного білка – від 0,7 (P14) до 476 (IBH) мкМ. Лише для АВМ у присутності нативного білка $ГД$ був 0.07 мкМ. До того ж, за таких концентрацій барвника, для половини зондів взагалі не спостерігається зростання інтенсивності більш, ніж у 2 рази, при будь-якій концентрації нативного білка. Значення $ГД$ були близькі до аналогічних значень ціанінових маркерів сироваткового альбуміну людини [240]. Таким чином, наявність у пробі для аналізу нативного білка, крім фібрилярного, не призведе до значних похибок, наприклад, у медичній діагностиці «конформаційних» захворювань з використанням бензантронових маркерів.

Важливим видається також виявити найбільш чутливі маркери до агрегатів лізоциму. Параметр n у присутності амілоїдних фібрил має значення $\sim 0,05$, хоча для зондів IAH, IBH, ISH, P10 стехіометрія зв'язування була у межах 0,3–0,5, а для AM19, FA, AM4, AM17, ThT – навіть у межах 0,01–0,02. Константи асоціації зондів були високі 0,2–1 мкМ⁻¹, хоча для P14, AM18, AM21, NR, AM17, AM19, FA вони становили від 5 до 450 мкМ⁻¹ [135,154,272]. Слід зауважити, що параметри зв'язування ThT з амілоїдними фібрилами лізоциму були на порядок нижчі, ніж наприклад, отримані у роботі А.І. Сулатської та І.М. Кузнецової за допомогою методу рівноважного діалізу, а квантовий вихід мав подібне значення [100,154]. Це може бути наслідком

різниці у морфології фібрил, сформованих у присутності різних денатурантів – соляної кислоти або гуанідинхлориду. Взагалі, отримані значення констант асоціації є достатньо високими, що вказує на можливість використання нових бензантронових зондів у якості амілоїдних маркерів [135].

Слід, однак, зазначити, що класичні маркери ThT та NR показали в ~5–20 раз вищі значення молярної флуоресценції та константи асоціації з фібрилами лізоциму, відповідно, ніж нові бензантронові зонди. Для того, щоб побудувати ряди специфічності зондів до фібрил лізоциму, використовували наступні параметри (розділ 2): а) квантовий вихід (Q) флуоресценції зонда; б) границя детектування ($ГД$) фібрилярного білка зондом; в) I/I_0 ; г) I/I_{nat} (таблиці 3.1, 3.2). Фінальний ряд, що показує зниження загальної чутливості зондів до фібрил: ThT → IAH → ABM → AM4, IBH → AM12 → A4, 3AM39 → AM15, AM2-23 → AM18-23, NR → AM3, AM18, P9, P11, ISH → AM1 → AM15-23 → AM20, A8 → AM2 → AM4-23 → P14 → A6, AM21 → P10 → AM19 → AM17 → FA.

Таким чином, жоден із зондів не проявив амілоїдну чутливість вищу, ніж у ThT. З іншого боку, 10 барвників мали вищу чутливість, ніж CR. В той же час, перевагою бензантронових зондів над ThT є значні зсуви максимумів флуоресценції при зв'язуванні з фібрилами білка, тобто про фізико-хімічні властивості оточення можна судити, аналізуючи максимуми флуоресценції барвників. Слід також відмітити, що параметр $ГД$ був на 1–3 порядки вищий у бензантронів, ThT, NR, ніж у класичних маркерів нативних білків ($ГД \sim 3$ нМ): сквараїну Р-3, зондів СВВ і Пірогалолу Червоного для сироваткового альбуміну [273,274].

Зонди IAH, ABM, AM4, IBH, AM12, A4, 3AM39, AM15, AM2-23, AM18-23 показали найвищу специфічність до агрегатів білка (зокрема, при зв'язуванні з F_{acs} майже для усіх зондів параметр $I/I_0 > 20$) та чутливість до зміни полярності оточення. При цьому A4, IAH, IBH хоч і мали у 2–4 рази нижчі значення квантового виходу у присутності фібрил білка, проте зростання їх інтенсивності відносно незв'язаного стану було на порядок вище, ніж у інших флуорофорів, отже їх теж можна рекомендувати у якості амілоїдних маркерів.

Два типи нових ціанінових амілоїдних маркерів фібрилярного α -синуклеїну: з високим квантовим виходом (Cyap40) або з високим зростанням квантового виходу (T-284, SH516), було також запропоновано у роботі К.Д. Волкової [240]. Висока чутливість та специфічність цих барвників до фібрил лізоциму та їх геометричні параметри, подібні до ThT, дозволяють припустити, що нові зонди локалізуються у жолобках фібрил, єдиному специфічному сайті зв'язування, характерному для білкових агрегатів даного типу [114,115]. Нарешті, зонди P14, AM21, P10, AM19, AM17, FA, що мали або велике значення квантового виходу у вільному стані, або незначне його зростання у присутності фібрил, показали найменшу чутливість до агрегатів білка.

Виникає запитання: чи достатньо апроксимувати ізотерми зв'язування барвників мономодальною моделлю? Для того, щоб це виявити, ми побудували залежності експериментального відношення «зв'язаний зонд/вільний зонд» (B/F) від фракції зв'язаного барвника (B), отримані шляхом титрування зондами фібрил F_{acs} (рис. 3.8). Усі графіки лінійні, що означає наявність одного типу сайтів зв'язування, і лише увігнуті донизу графіки A18-23 (A), IAH, A8 (B), ISH (B) та IBH (Г) свідчать про появу додаткових неспецифічних сайтів для цих барвників на молекулі білка, окрім потенційного основного сайту – жолобків фібрил [242]. Для цих зондів у розділі 3.1.6 проведено апроксимацію ізотерм зв'язування двохсайтовою моделлю (розділ 2.6.1). Цікаво, що ThT мав 2 типи сайтів зв'язування з фібрилами лізоциму, що показано у роботі А.І. Сулатської методом рівноважного діалізу, на противагу отриманим нами результатам [100]. З іншого боку, лінійність графіків Скетчарда може свідчити про нефлуоресцентну природу другого сайту зв'язування, як у випадку ThT та фібрил інсуліну, що може призвести до похибок в оцінках параметрів зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами [1]. Тому для визначення величини похибки важливо оцінити значення параметрів хоча б для тих зондів, що мали

нелінійні графіки Скетчарда. Як зазначено вище, це свідчить про залежність морфології фібрил від умов агрегації білка.

3.1.2. Бензантронові зонди та фібрили лізоциму, отримані за умов кислотної денатурації або у концентрованому етанольному розчині

На другому етапі роботи з ряду специфічності бензантронових зондів обрали найбільш специфічні (ІАН, АМ4, ІВН, АМ12) і ті, що мають середню чутливість (ІШН, АМ15, АМ18, АМ1, АМ3, АМ2, А6) для оцінки їх здатності розрізняти морфологію фібрил лізоциму, отриманих *in vitro* за умов кислотної денатурації без шейкінгу (F_{ac}) або у концентрованому етанольному розчині (F_{eth}) (розділ 2.2). У кислому середовищі без шейкінгу (на відміну від методу у розділі 3.1.1), фібрили утворювали для того, щоб отримати значну різницю у морфології агрегатів F_{ac} та F_{eth} (розділ 2). У цьому випадку параметри зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами було визначено шляхом титрування зондів білком.

Зразки фібрил лізоциму, отримані двома різними методами, мають типову для амілоїдів нерозгалужену, паличкоподібну структуру, і на електронних фотографіях не видно аморфного матеріалу (розділ 2.3). Однак різна довжина ($\sim 0,9$ та $\sim 0,9\text{--}1,5$ мкм) і діаметр (25 ± 2 та $7\pm 0,6$ нм, відповідно) фібрил F_{eth} та F_{ac} свідчать про відмінності у їх внутрішній структурі.

На рис. 3.9 та 3.10 показано типові спектри флуоресценції зондів при їх титруванні фібрилами F_{eth} та F_{ac} та ізотерми зв'язування цих барвників з фібрилами. Цікаво, що насичення білком F_{eth} відбувалося при його концентраціях, на порядок нижчих, ніж F_{ac} . Дійсно, константи асоціації або стехіометрія зв'язування зондів з F_{ac} були приблизно на порядок нижчі, ніж з F_{eth} , крім АМ4 (таблиці 3.3, 3.4). Параметри зв'язування АМ4, вочевидь, менш чутливі до зміни полярності та в'язкості оточення. Це свідчить про нижчу полярність оточення барвників у F_{eth} , що підтверджується короткохвильовими зсувами максимумів флуоресценції у F_{eth} відносно F_{ac} . Також ступінь іммобілізації зондів у F_{eth} може бути сильніший, ніж у F_{ac} , бо *жорсткість*

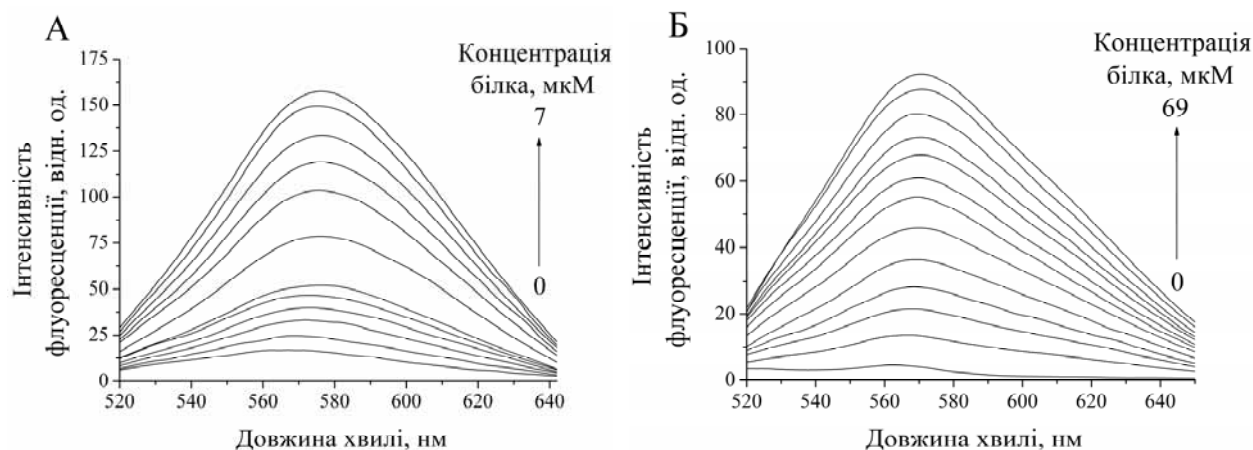


Рисунок 3.9. Спектри флуоресценції AM15, отримані при титруванні зонда фібрилами F_{eth} (а) або F_{ac} (б). Концентрація зонда була 8,7 мкМ (А) або 0,8 мкМ (Б)

фібрил пропорційна силі водневих зв'язків між поліпептидними ланцюгами, що посилені у фібрилах F_{eth} відносно F_{ac} [271]. Крім того, *жорсткість згинання* F_{eth} вища, ніж F_{ac} , пропорційно до числа протофіламентів у фібрилах, оскільки перший тип має 2 протофіламенти, а другий – один (судячи з товщини та умов приготування) [38,85,193, 231,275].

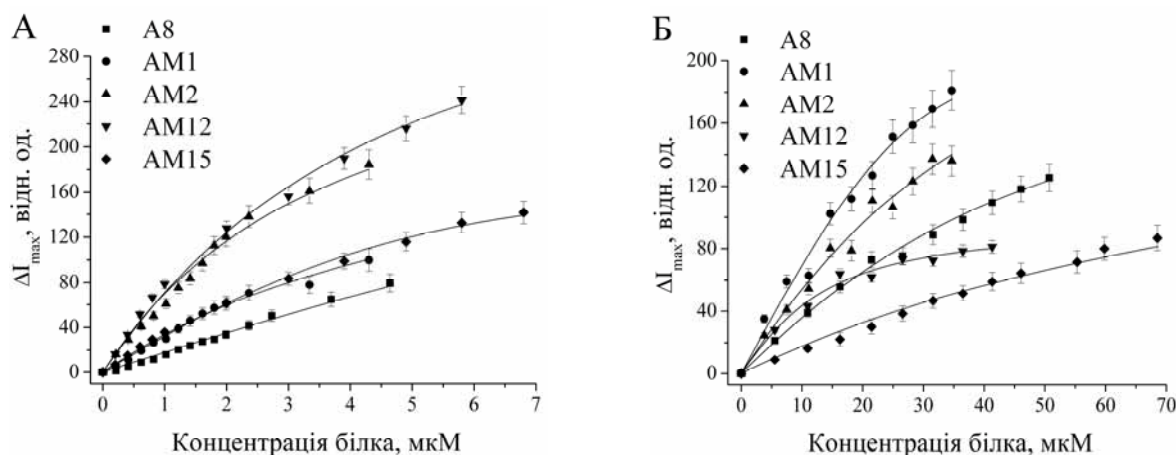


Рисунок 3.10. Ізотерми зв'язування бензантронових зондів з фібрилами F_{eth} (А) та F_{ac} (Б). Концентрації зондів А8, АМ1, АМ2, АМ12 та АМ15: 1,6, 0,1, 0,1, 16,3, 8,7 мкМ, відповідно (А), та 1,3, 3,4, 20,2, 2,1, 0,8, відповідно (Б)

Як видно з таблиць 3.3, 3.4, зонди А4, А6, АМ1, АМ2, АМ3, АМ4, АМ18 та ІВН мають вищі значення квантового виходу (Q) при їх зв'язуванні з фібрилами F_{eth} . Зокрема, квантовий вихід зондів АМ1 та АМ2 у присутності F_{eth} у 10 та 19 разів вищий, ніж у присутності F_{ac} . Для решти зондів (А8, АМ12,

Таблиця 3.3

Характеристики зв'язування бензантронових зондів з фібрилами лізоциму, отриманими у концентрованому етанольному розчині (F_{eth})

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	I/I_0	$I/I_{нат}$	Q	ЧЗМФ, нм	$\lambda_{em}^{F_{eth}}$, нм
A4	2,9	0,2	5,2	3,7	0,07	7	630
A6	27	0,23	2,4	-	0,43	6	586
A8	1,7	0,22	1,9	-	0,52	14	583
AM1	2	0,22	5,7	-	0,73	21	593
AM2	5	0,35	38,4	-	0,77	3,5	575
AM3	70	0,56	9,7	-	0,38	2	575
AM4	2,6	0,2	3,7	3,1	0,56	19,5	580
AM12	0,23	3,7	6,8	3,9	0,12	0	578
AM15	0,44	1,9	7,4	3,2	0,07	0	577
AM18	1,9	0,78	5,8	-	0,52	0	565
IAH	0,1	3	10,9	7	0,06	10	594
IBH	0,5	0,8	13,6	7,6	0,14	11,5	602
ISH	0,4	0,7	7,9	5,9	0,13	13	605
ThT	0,04	7,6	2,8	1,2	0,3	0	480

Таблиця 3.4

Характеристики зв'язування бензантронових зондів з фібрилами лізоциму, отриманими за допомогою кислотної денатурації (F_{ac})

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	I/I_0	$I/I_{нат}$	Q	ЧЗМФ, нм	$\lambda_{em}^{F_{ac}}$, нм
A4	0,06	1	1,2	1,2	0,02	8	645
A6	1,2	0,22	1,5	-	0,31	16	604
A8	0,82	0,04	1,1	-	0,65	22	580
AM1	2,1	0,13	3,5	-	0,08	10	586
AM2	0,06	0,8	1,7	-	0,04	22	582
AM3	0,29	0,43	2,7	-	0,10	30	586
AM4	0,1	1,7	2,5	1,9	0,27	17	603
AM12	0,7	0,21	1,8	4,2	0,20	18	576
AM15	0,23	0,08	1,8	2,7	0,42	17	571
AM18	4,6	0,54	6,5	-	0,26	17	571
IAH	2,3	0,21	6,1	4,3	0,11	14	621
IBH	0,15	0,7	2,3	1,4	0,11	15	626
ISH	0,08	3,9	6,4	3,5	0,3	12	628
ThT	0,03	2	1,4	0,7	0,1	0	488

AM15, IAH, ISH) спостерігається протилежний ефект – їх квантовий вихід нижчий у присутності F_{eth} . Поведінку квантового виходу останніх барвників пояснити важко, оскільки для бензантронів цей параметр підвищується пропорційно зростанню в'язкості та зниженню полярності оточення. Ряди падіння специфічності барвників до амілоїдних фібрил двох типів, отримані за допомогою порівняння параметрів I/I_0 , I/I_{nat} та Q (таблиці 3.3, 3.4), наведені нижче. Варто відзначити, що параметри I/I_0 та I/I_{nat} розраховували при концентраціях зонда та білка 1 та 2 мкМ, відповідно (на відміну від розрахунків у розділі 3.1.1).

Фінальний ряд для F_{eth} : AM2 → AM1 → A8 → A6 → IBH → AM18 → AM3 → AM4 → IAH → ISH → ThT → AM12 → A4 → AM15.

Фінальний ряд для F_{ac} : A8 → A6 → AM18 → ISH → IAH → AM1 → AM15 → AM12 → AM4 → IBH → AM3 → ThT → A4 → AM2.

Виявилось, що AM2, зв'язаний із фібрилами F_{eth} , має найбільше значення I/I_0 (38) та Q (0,6), а також значну специфічність саме до фібрил лізоциму I/I_{nat} (5). Також цей зонд має найвищу чутливість до морфології фібрил, через його низьке значення Q (0,035) у присутності F_{ac} . Зонди A6 та A8 можна використовувати для детектування фібрил обох типів, але вони мають значно нижчу чутливість до їх морфології. Решту барвників також можна використовувати для визначення структурних відмінностей агрегатів лізоциму. Цікавим є факт, що для більшості бензантронів полярність сайтів зв'язування спадала у такому ряді фібрил: $F_{ac} > F_{eth} > F_{acs}$, про що зробили висновок, судячи з положень максимумів флуоресценції зондів $\lambda_{em}^{F_{eth}}$, $\lambda_{em}^{F_{ac}}$ та $\lambda_{em}^{F_{acs}}$, відповідно, який, напевне, корелює з полярністю фібрил (таблиці 3.2, 3.3, 3.4).

Тепер розглянемо відмінності у структурі фібрил лізоциму двох типів для визначення різниці у мікрооточенні бензантронів зондів, що зумовило їх різну чутливість до цих агрегатів. Загальновідомим є той факт, що морфологія фібрил визначається умовами їх росту [276,277]. У випадку лізоциму, ріст фібрил розглядається як двохстадійний кооперативний процес, у якому денатурація α -структури нативного білка передуює формуванню β -листів [98].

Морфологія цих агрегатів залежить від рН [59,276], температури [38,278], іонної сили [38,276], наявності органічних розчинників [6,279], швидкості перемішування [195,276], тощо. У присутності 80% етанолу, за умов нейтрального рН та безперервному перемішуванні, лізоцим приймає гнучку конформацію «зламаного стрижня», що уповільнює дифузію білка та слугує позитивним ефектором формування міжмолекулярного β -листа [280]. Ця конформація характеризується розширеним вмістом α -спіральної структури, зміненою гідратною оболонкою та третинною структурою [281,282]. Зокрема, низька діелектрична константа білкового оточення викликає дегідратацію макромолекули, що, у свою чергу, знижує між- та внутрішньомолекулярні взаємодії, та викликає проникнення розчинника у гідрофобну область білка. Така ситуація продемонстрована, наприклад, для пептиду LYS (11-36) у трифторетанолі [282]. Схоже, що етанол посилює між- та внутрішньомолекулярні водневі зв'язки у водному середовищі [265]. За наявності етанолу здатність розчинника зв'язуватись з карбонільною групою пептиду знижується у порівнянні з білковими акцепторами цієї групи [282]. Слід зауважити, що етанол має слабку здатність викликати денатурацію лізоциму, проте перемішування значно посилює вірогідність того, що мономер білка «зустріне» гідрофобну поверхню і його конформація дестабілізується [195,276].

У свою чергу, низьке значення рН (~ 2) та температура (57°C), при якій білок є частково денатурованим [194], найбільш сприятливі для формування амілоїдних фібрил [194,265]. Такий денатурований стан характеризується значним порушенням третинної структури і частковою втратою вторинної структури білка [265,283]. Зміни у конформації лізоциму контролюються декількома факторами. По-перше, нейтральність глутамінової та аспарагінової кислот при рН 2 призводить до збільшення позитивного заряду білка та посилює внутрішньомолекулярне електростатичне відштовхування [284,285]. По-друге, і кисле середовище [98,265], і підвищена температура [286] викликають часткову експозицію гідрофобних частин молекули до розчинника

та послаблюють внутрішньомолекулярні водневі зв'язки [287,288]. Також ці фактори призводять до зниження гідратації лізоциму [289,290]. Нарешті, інкубація білка за таких умов викликає більш значні зміни вторинної структури лізоциму, ніж його інкубація у присутності етанолу та при нейтральному рН [195,276]. Цікаво, що молекула лізоциму зберігає нативну структуру навіть при $\text{pH} \sim 0.6$, і лише комбінація низького рН та високої температури сприяє фібрилогенезу [238]. Часткова фрагментація молекули можлива при її тривалій інкубації у кислому середовищі, тому у структуру фібрил можуть входити також фрагменти лізоциму [59,98].

Схематичні зображення двох частково розгорнутих станів лізоциму показано на рис. 3.11. В цілому, перший стан (формує фібрили F_{eth}) характеризується експозицією гідрофобних частин до розчинника [280], зниженою гідратацією [279] та посиленням між- та внутрішньо- молекулярних водневих зв'язків [265]. Другий стан (що формує фібрили F_{ac}) також має гідрофобні частини, експоновані до розчинника [98,286], значний позитивний заряд [285], послаблені міжмолекулярні водневі зв'язки та нижчий ступінь

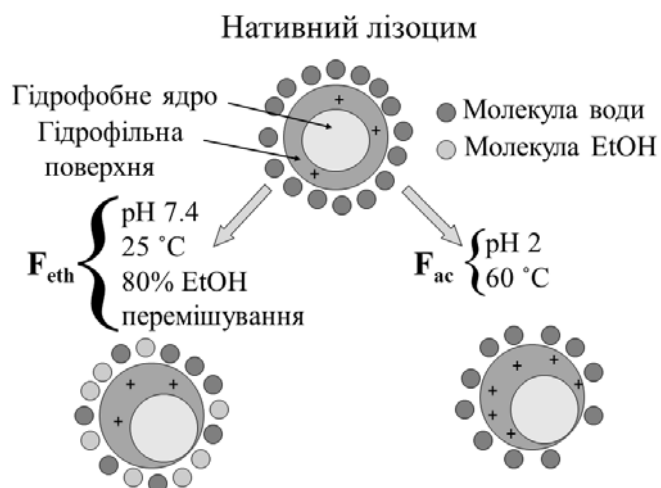


Рисунок 3.11. Схематичне зображення частково денатурованого стану лізоциму при двох типах умов, що призводять до формування фібрил F_{eth} та F_{ac}

гідратації [287-290]. Значна дестабілізація молекули у цьому стані також підтверджується більшою кількістю утворених фібрил F_{ac} , ніж F_{eth} [195,228]. Нарешті, у фібрилогенезі F_{ac} гідрофобні взаємодії та електростатичне відштовхування відіграють більш важливу роль.

Відмінності частково денатурованих станів білка можуть призводити до наступних

морфологічних змін у структурі фібрил: 1) різна кількість протофіламентів (що показано вище); 2) специфічне упорядкування протофіламентів; 3) відмінності у

характері пакування β -листів («стеричної блискавки») [291]. Наприклад, у роботі Й. Зурдо продемонстровано залежність числа та способу пакування протофіламентів фібрилярного домену SH3 від рН, що може бути наслідком відмінностей у силі електростатичних взаємодій між молекулами білка [284]. Робота Р. Верела виявила відмінності у стекінгу двох β -листів у «стеричну блискавку» $\text{ss}\beta$ -р пептиду за умов кислого та нейтрального рН [292]. В дослідженнях А.Т. Петкової показано, що β -листи $\text{A}\beta$ (11-25) пептиду при кислому рН складаються з коротших β -ланцюгів, ніж при фізіологічному рН [293]. Нарешті, більший діаметр F_{eth} у порівнянні з F_{ac} може бути наслідком більшої товщини і числа протофіламентів [38,294]. Зниження діаметра може бути зумовлено посиленою асоціацією протофіламентів під час перемішування та електростатичною стабілізацією їх комплексу [51,293]. Цікаво, що посилена асоціація протофіламентів також може призвести до часткового гальмування фази елонгації, а тому фібрили F_{eth} трохи коротші, ніж F_{ac} [295,296].

Виникає запитання: на які саме відмінності у структурі фібрил «реагують» ThT та нові барвники? Класичний амілоїдний маркер має менші значення стехіометрії зв'язування та квантового виходу у присутності фібрил F_{ac} , ніж F_{eth} . Можна припустити, що протофіламенти F_{ac} складаються з коротших β -ланцюгів, ніж F_{eth} , сформованих при нейтральному рН, як було показано для $\text{A}\beta$ (11-25) [293]. Тому число жолобків амілоїдних фібрил – сайтів зв'язування для специфічних барвників, може знизитися, що призведе до зниження кількості місць зв'язування зонда на молекулі білка. Також β -листи фібрил двох типів, певне, мають різну кластеризацію гідрофобних частин, так само як і фібрили пептиду $\text{ss}\beta$ -р, отримані за умов кислого та нейтрального рН [292]. Зокрема, області стекінгу двох сусідніх β -листів – жолобки, що складаються з незаряджених або з протилежно заряджених залишків амінокислот. За умов кислого рН протонування залишку глутамінової кислоти знижує ступінь кластеризації гідрофобних областей β -листів через виникнення у кластері жолобків, що мають позитивно заряджений аргінін, внаслідок чого ThT перестає зв'язуватися з цим жолобком. Тому і зниження констант асоціації

половини бензантронових зондів у присутності F_{ac} можна пояснити їх взаємодією з позитивно зарядженими жолобками фібрил. Таку поведінку спостерігали у нейтрального аналогу ThT – сполуки В Пітсбурга [166]. Зниження стехіометрії зв'язування більшості нових зондів з фібрилами F_{ac} у порівнянні з F_{eth} може бути зумовлене меншим розміром жолобків, що ускладнює зв'язування барвників з агрегатами білка, у випадку різної кластеризації β -листів фібрил. Зонди тепер будуть локалізуватися в області з вищою полярністю (таблиці 3.3, 3.4) і мати нижчий квантовий вихід у F_{ac} , ніж у F_{eth} . Цікаво, що більша гнучкість F_{ac} хоч і призводить до зниження періоду закручення β -листа у протофіламенті, але не може призвести до значного зниження стехіометрії зв'язування зондів (вони не зв'язуються із короткими та закрученими β -листами нативних білків і, певне, з фібрилами у місцях закручення жолобків [155,297,298]), бо період закручення високий і складає від 45 до 200 нм для фібрил лізоциму [98,194,228,282]. Зауважимо, що значна різниця у квантовому виході нових зондів свідчить не лише про різну морфологію агрегатів лізоциму, але і про те, що на специфічність зв'язування впливають різні молекулярні властивості барвників.

На наступному етапі роботи було проведено оцінку чутливості бензантронових зондів A4, A6, A8, AM1, AM2, AM3, AM4 (усі зонди, крім A4 показали високу чутливість до F_{eth}) до *пре-фібрилярних агрегатів* лізоциму, отриманих у концентрованому етанольному розчині. Зростання флуоресценції зондів у присутності цих токсичних агрегатів свідчить про їх здатність детектувати також короткі β -листи, і мати сайти зв'язування з білком, відмінні від жолобків (рис. 3.12).

З таблиць 3.3 та 3.5 видно, що зонд AM4 має більший параметр I/I_0 (~ 5) при асоціації з *пре-фібрилярними агрегатами* білка, ніж з фібрилами ($I/I_0 \sim 4$), а зонд AM2 має значно вищу специфічність до зрілих агрегатів лізоциму. Також ці барвники проявили меншу чутливість до нативного білка (I/I_{nat}), ніж до олігомерів або фібрил лізоциму, відповідно. Таку поведінку зондів можна пояснити залежністю їх флуоресценції від полярності оточення. Так, зонд AM2,

схоже, добре світить у неполярному середовищі, як показано вище на основі порівняння його чутливості до амілоїдних фібрил двох типів. Крім того, максимуми флуоресценції бензантронів в олігомерах (таблиця 3.5, λ_{em}^{olig}) показують, що полярність сайтів зв'язування АМ2 та АМ4 нижча у фібрилах (зсуви максимумів становили -20 та -10 нм, відповідно), а для решти зондів – приблизно однакова. У порівнянні з АМ2, АМ4 має нижчу чутливість до зміни в'язкості та полярності оточення, що призводить до зростання n зонда в олігомерах. Решта флуорофорів показали вищу специфічність до зрілих фібрил білка, ніж до олігомерів.

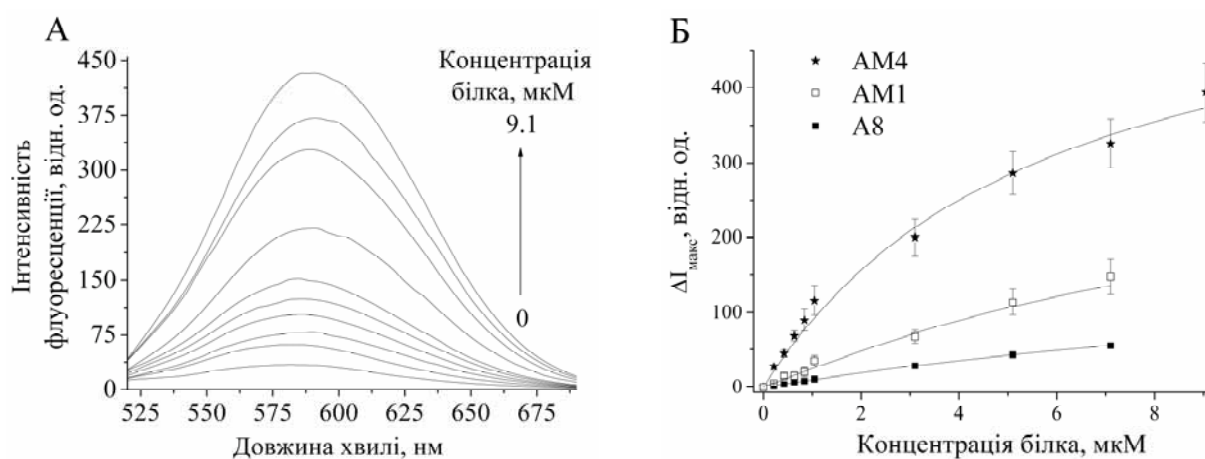


Рисунок 3.12. Спектри флуоресценції АМ4 (А) та ізоТЕРМИ зв'язування зондів АМ4, АМ1 та А8 (Б), отримані при титруванні зонда пре-фібрилярними агрегатами лізоциму. Концентрація зондів АМ4, АМ1 та А8 – 2, 0,5 та 1 мкМ, відповідно

Таблиця 3.5

Кількісні характеристики зв'язування бензантронів з олігомерами лізоциму

Зонд	A4	A6	A8	AM1	AM2	AM3	AM4
K_a , мкМ ⁻¹	0,8	5,7	13,7	14,2	1	21,6	0,3
n	0,14	0,19	0,14	0,07	0,23	0,11	0,98
I/I_0	2,6	1,5	1,5	1,5	1,7	2,3	4,9
I/I_{nat}	4,1	-	-	-	-	-	3,5
Q	0,08	0,42	0,3	0,25	0,1	0,48	0,47
λ_{em}^{olig}	626	585	584	595	594	579	590

3.1.3. Зонди АВМ, тіофлавін Т та нільський червоний і фібрили інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації та шейкінгу

У подальших експериментах цікавим також було визначити чутливість бензантронів, а також їх параметри зв'язування з амілоїдними фібрилами Ins_{acs} (розділ 2.2). Дослідження проводили для одного з найбільш специфічних до лізоциму зондів – АВМ, і маркерів ThT та NR. Спектри поглинання CR, кругового дихроїзму, флуоресценції ThT, електронна мікрофотографія підтверджують утворення амілоїдних фібрил інсуліну (розділ 2).

Спектри флуоресценції флуорофорів при максимальному ступені асоціації зонда з білком та ізотерми зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs} , отримані при титрування зондів білком, показані на рис. 3.13. Ізотерми зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом, показані на рис. 3.14А. Максимуми флуоресценції ThT, АВМ та NR, зв'язаних з Ins_{acs} , зсунуті у довгохвильову область відносно максимумів у лізоцимі (таблиця 3.6, $\lambda_{\text{em}}^{\text{Ins}_{\text{acs}}}$). Також зсув максимуму флуоресценції 1,8-АНС у присутності фібрил інсуліну становив -40 нм, а інтенсивність флуоресценції зросла у ~8 разів (рис. 3.15). Це означає вищу полярність сайтів зв'язування інсуліну для барвників, або нижчий ступінь експонування гідрофобних залишків до розчинника, ніж у випадку F_{acs} (розділ 3.1.1). Титрування зондів нативним інсуліном не проводили через слабку розчинність інсуліну у буфері з рН 7.4. Виявилось, що стехіометрія зв'язування для зондів на порядок нижча, ніж у присутності лізоциму F_{acs} , крім NR, що мав у 2 рази більше сайтів зв'язування у фібрилах інсуліну (таблиця 3.6). Константи асоціації у присутності Ins_{acs} знизились відносно лізоциму для NR, АВМ, а у випадку ThT не змінилися. Вищі константи асоціації АВМ та NR з F_{acs} можуть свідчити, зокрема, про більш сильні гідрофобні та ароматичні зв'язки комплексу «лізоцим-зонд», а також про слабші стеричні обмеження [149,228,299]. Навпаки, зниження параметрів K_a та n досліджуваних зондів (крім NR) можна пояснити збільшенням полярності оточення внаслідок зв'язування з гідрофільними жолобками фібрил Ins_{acs} у порівнянні з жолобками F_{acs} , тобто у

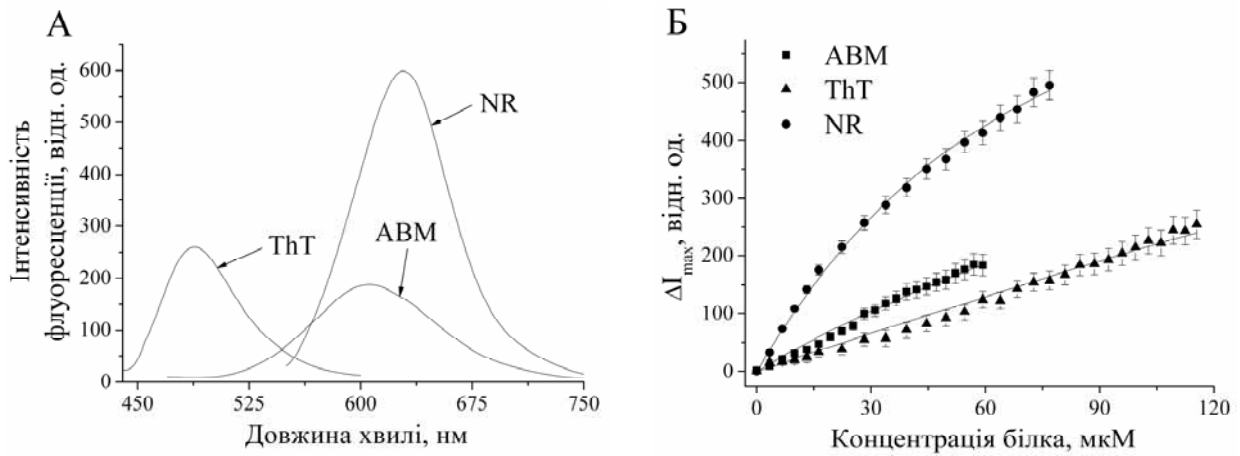


Рисунок 3.13. Спектри флуоресценції ABM, ThT, NR при максимальному насиченні зонда білком (А) та ізоТЕРМИ зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs} , отримані шляхом титрування зонда білком (Б). Концентрації ABM, ThT, NR – 0,2, 0,1, 0,45 мкМ, відповідно

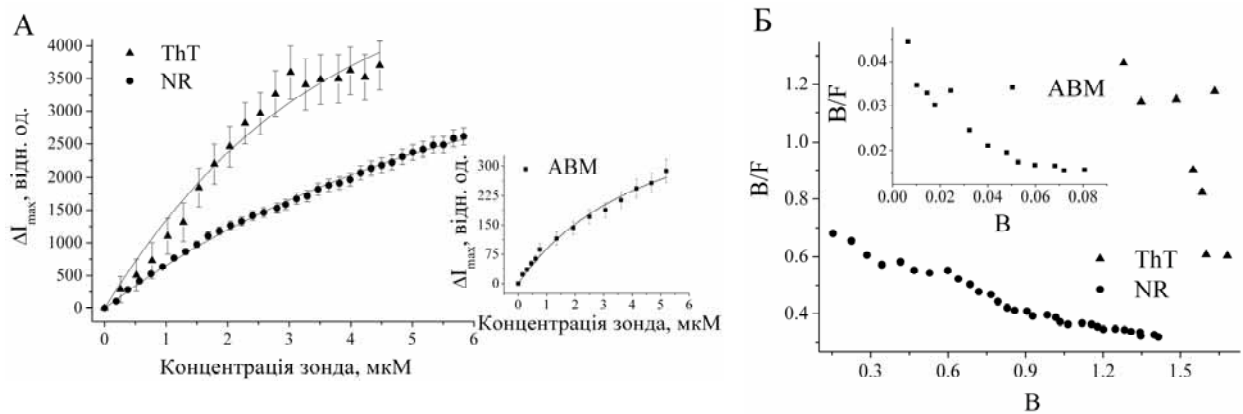


Рисунок 3.14. ІзоТЕРМИ зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs} (34 мкМ), отримані шляхом титрування білка зондом (А) та залежності експериментального відношення «зв'язаний зонд/вільний зонд» B/F від фракції зв'язаного зонда B з Ins_{acs} (Б)

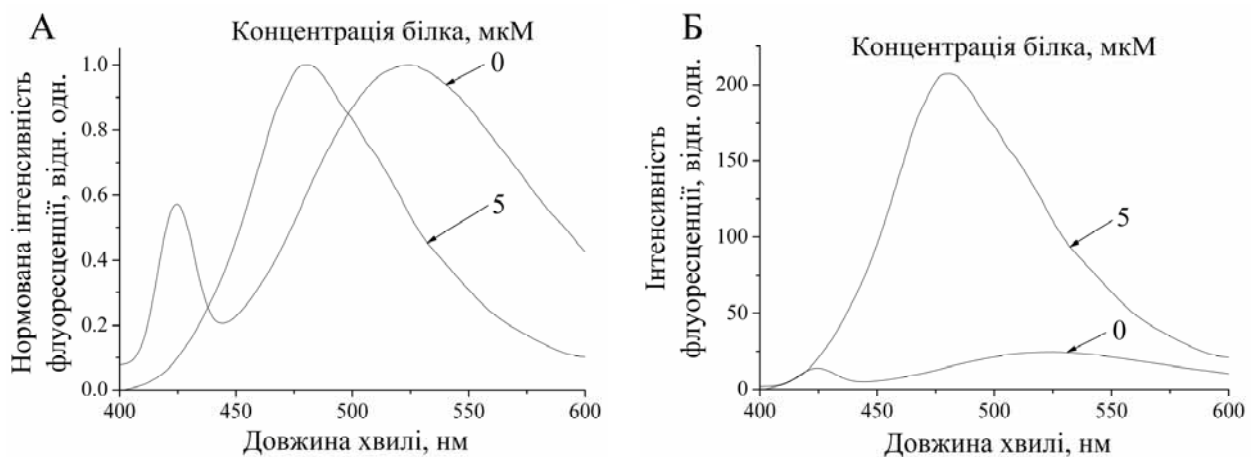


Рисунок 3.15. Спектри флуоресценції 1,8-АНС (5 мкМ) у фібрилах Ins_{acs} (5 мкМ)

Характеристики зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs}

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	α , мкМ ⁻¹	Q	$\lambda_{em}^{Ins_{acs}}$, нм	I/I_0	$ГД$, мкМ	ΔG , кДж/ моль	Q/Q_0
ThT	0,47	0,065	3000±30	0,13	488	151	0,07	-32	134
ABM	0,2	0,004	3571±36	0,52	606	5	5,2	-30	65
NR	0,2	0,08	1848±19	0,06	632	11	1,5	-30	15

фібрилах інсуліну ступінь кластеризації гідрофобних залишків амінокислот нижчий. Для ThT параметр n був у 3 рази нижчий, ніж теоретично розрахований для фібрил інсуліну (виходячи з їх геометрії), що підтверджує обмежену доступність сайтів зв'язування зонда [1]. Цікаво, що ThT та NR асоціюють саме із жолобками фібрил, оскільки графіки Скетчарда показали наявність лише одного (специфічного) сайту зв'язування (рис. 3.14Б). Квантовий вихід ABM зріс на 50%, ThT – знизився у ~7 разів, а у NR – не змінився. $ГД$ для інсуліну нижче в рази у ABM та NR, а у ThT $ГД$ для лізоциму та інсуліну схожі. При цьому параметр I/I_0 у ThT виріс на 50% відносно лізоциму, а у решти зондів – знизився.

Фінальний ряд падіння специфічності до Ins_{acs} має вигляд: ThT→ABM→NR (хоча ABM мав найбільше значення квантового виходу). Тобто ABM має нижчу чутливість до фібрил Ins_{acs}, ніж ThT, але вищу, ніж NR. Залежності експериментального відношення «зв'язаний зонд/вільний зонд» від фракції зв'язаного зонда показані на рис. 3.14Б. Отже, інсулін має як мінімум два типи сайтів зв'язування для ABM, тоді як лізоцим – один.

Мікрофотографію агрегатів Ins_{acs} наведено у розділі 2.3. Фібрили виявились на ~30% тонші та на ~50% коротші, ніж фібрили F_{acs}, але у 2 рази товщі, ніж фібрили F_{ac}. Такі результати підтверджуються літературними даними [193,197,198]. Зауважимо також, що за умов шейкінгу фібрили лізоциму та інсуліну мали 2 протофіламенти у своєму складі (їх діаметри ~17 і 20 нм, відповідно), тому їх товщина може залежати від структури

протофіламентів та сили їх взаємодії [193,300]. Зокрема, у $\sim 3\text{--}10$ разів нижча стехіометрія зв'язування АВМ та ThT з Ins_{acs} у порівнянні з F_{acs} свідчить про більш щільне пакування протофіламентів у фібрилі Ins_{acs} . Щільність пакування зростає пропорційно *модулю еластичності* агрегатів білка у Ins_{acs} відносно F_{acs} через меншу довжину поліпептидного ланцюга, що формує ядро фібрили інсуліну [270]. Тобто у даному випадку дуже висока жорсткість фібрил заважає зв'язуванню барвників, що добре видно по значному падінню квантового виходу ThT у Ins_{acs} . Однак, зонд АВМ мав вище значення квантового виходу у Ins_{acs} , можливо, через вклад додаткових сайтів зв'язування (наприклад, гідрофобних порожнин). Незважаючи на всі відмінності у структурі фібрил F_{acs} та Ins_{acs} , зонд АВМ не проявив здатності розрізняти морфологію фібрил F_{acs} та Ins_{acs} ні через зміни квантового виходу, ні через зсуви максимуму флуоресценції. Натомість, ThT може розрізняти фібрили лізоциму та інсуліну шляхом зміни квантового виходу.

3.1.4. Сквараїнові зонди і фібрили лізоциму та інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації

Даний етап роботи присвячено тестуванню чутливості нових сквараїнових зондів до фібрил лізоциму F_{ac} (F_{acs}) та інсуліну Ins_{ac} (Ins_{acs}). Електронні фотографії Ins_{ac} представлено у розділі 2.3. Зокрема, наші зусилля були спрямовані на виявлення кращих маркерів до агрегатів білка шляхом порівняння їх параметрів зв'язування та квантового виходу.

Так само, як і у випадку бензантронів, сквараїни мають низьке значення квантового виходу у буфері (для G1, G2, G4 цей параметр вищий, ніж для G5, G6, G7, рис. 3.16) завдяки високому ступеню нерадіаційних перетворень енергії збудження (наприклад, молекула може втрачати планарність) [301], хоча перенос енергії проходить у центральному кільці циклобутану [239], а наявність цього кільця знижує ступінь внутрішнього обертання флуорофора у порівнянні з ціаніновими зондами [214,302]. Дійсно, нові барвники мали вуглеводневі та/або ароматичні замісники в області донорів, перпендикулярні до центрального кільця, що знижує кон'югацію у системі донор–акцептор–

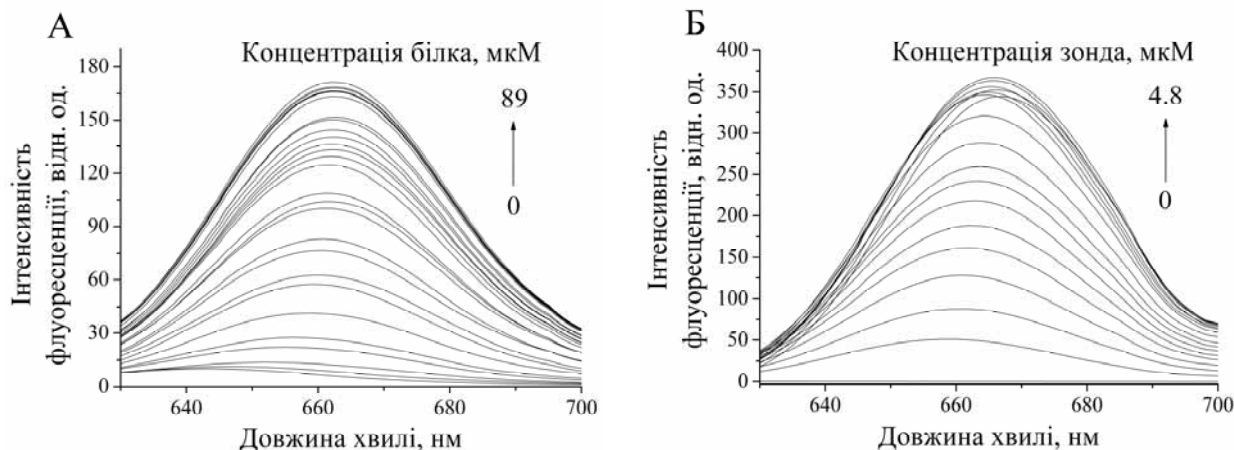


Рисунок 3.16. Спектри флуоресценції G6 у фібрилах F_{ac} при титруванні зонда білком (А) та титруванні білка зондом (Б). Концентрації зонда та білка були: 0,027 (А) та 4,8 мкМ, відповідно

донор (Д–А–Д), як показано у розділі 5. Із рис. 3.16 також видно, що зв'язування сквараїнів з фібрилами F_{ac} супроводжується значним зростанням квантового виходу та довгохвильовими зсувами максимумів флуоресценції зондів, що свідчить про зниження полярності і зростання в'язкості оточення флуорофорів. Це узгоджується з даними для бензантронів і попередніми даними, щодо чутливості сквараїнових барвників до стану розпавленої глобули амілоїдогенного бета-лактоглобуліну [217,219]. Спектри флуоресценції барвників при насиченні зонда білком представлено на рис. 3.17, а параметри зв'язування – у таблиці 3.7.

Максимуми флуоресценції зондів (крім G5) показали зсув на 22 нм у довгохвильову область в амілоїдних фібрилах відносно буфера (таблиця 3.7, λ_0 та λ_{em}^{LzF}) [216,217].

Червоні зсуви максимумів барвників відносно буфера є показником їх гідрофобного оточення, як показано, наприклад, для ціаніну IR806 та сквараїнів [303,304], а також зростання ступеня кон'югації Д–А–Д (планарності) у присутності фібрил [239]. Також батохромний зсув максимумів абсорбції спостерігався у ціанінів з полієноподібною структурою типу «с», що має позитивний заряд на атомі азоту та негативний – на атомі кисню (як і у сквараїнів) [305]. З іншого боку, специфічний Д–А–Д характер (наприклад,

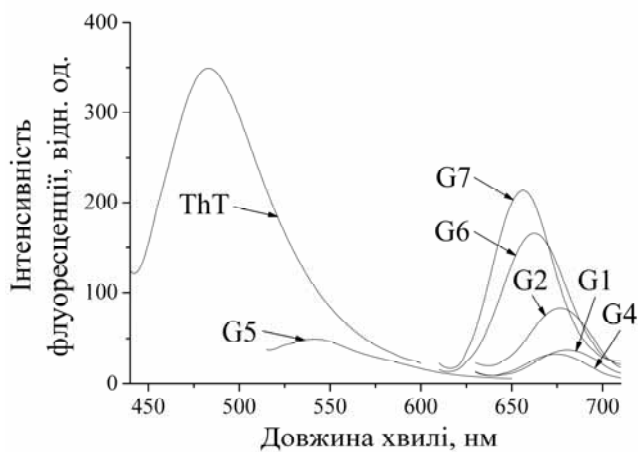


Рисунок 3.17. Спектри флуоресценції сквараїнових зондів у присутності фібрил F_{ac} . Концентрації зондів (білка) становили: 0,043 (104), 0,04 (112), 0,033 (63), 0,06 (89), 0,027 (89), 0,06 (102), 0,06 (95) мкМ для зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7, ThT, відповідно

довжині хвилі 610 нм) не реагувала на асоціацію зонда з білком. Модулі зсувів максимумів флуоресценції сквараїнів у присутності фібрил відносно нативного білка (таблиця 3.7, λ_{em}^{LzN}) становили 1–16 нм, що означає нижчу полярність сайтів зв'язування барвників з нативним лізоцимом, і неможливість асоціації з його гідрофобними порожнинами, як у випадку бензантронів (через більші просторові розміри сквараїнових зондів). На рис. 3.18, 3.19А зображено ізотерми зв'язування барвників з фібрилами лізоциму F_{ac} , отримані за допомогою титрування зонда білком та білка зондом, відповідно. Рис. 3.19Б показує нелінійність графіків Скетчарда для зондів G2, G4, ThT. Сквараїни показали низьку чутливість до нативного лізоциму (рис. 3.20, таблиця 3.7), що узгоджується з результатами попередніх досліджень [214,273]. Зокрема, константи асоціації та квантові виходи флуорофорів були на 1–4 порядки вищі для фібрил, ніж для нативного білка. До того ж, SO_3^- -групи G5 та G7 можуть послаблювати взаємодії зонд-білок [207]. Поряд з цим, K_a і n для процесу асоціації нових зондів з нативним лізоцимом були на 1–3 порядки та у 2–5 разів нижчі, відповідно, ніж параметри зв'язування сквараїнів SQ-3 та NN127 з

протонування SO_3^- -групи [306]) може призвести до появи додаткових максимумів поглинання та флуоресценції G5 в області ~490 та 545 нм, відповідно [239]. Максимум флуоресценції G5 при збудженні зонда на довжині хвилі 445 нм був зсунутий на 40 нм у короткохвильову область у присутності фібрил лізоциму, що теж свідчить про зниження полярності оточення [273]. Флуоресценція другої популяції G5 в області ~650 нм (при збудженні на

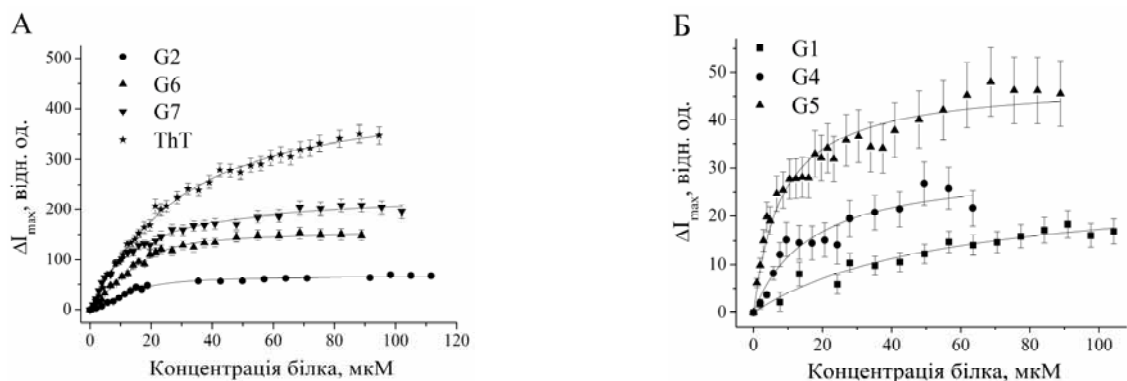


Рисунок 3.18. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами лізоциму F_{ac} , отримані шляхом титрування зонда білком. Концентрації зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7, ThT: 0.043, 0.04, 0.033, 0.06, 0.027, 0.06, 0.06 мкМ, відповідно

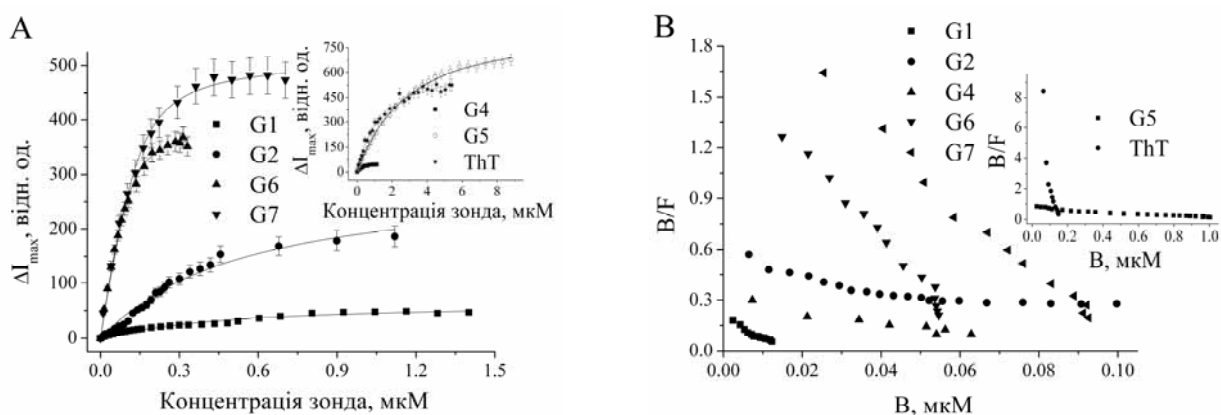


Рисунок 3.19. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами лізоциму F_{ac} , отримані шляхом титрування білка зондом (А) та залежності експериментального відношення «зв'язаний зонд/вільний зонд» (B/F) від фракції зв'язаного зонда (В). Концентрації білка: 9.5, 2, 4.8, 9.3, 4.8, 4.8, 3.6 мкМ для зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7, ThT, відповідно

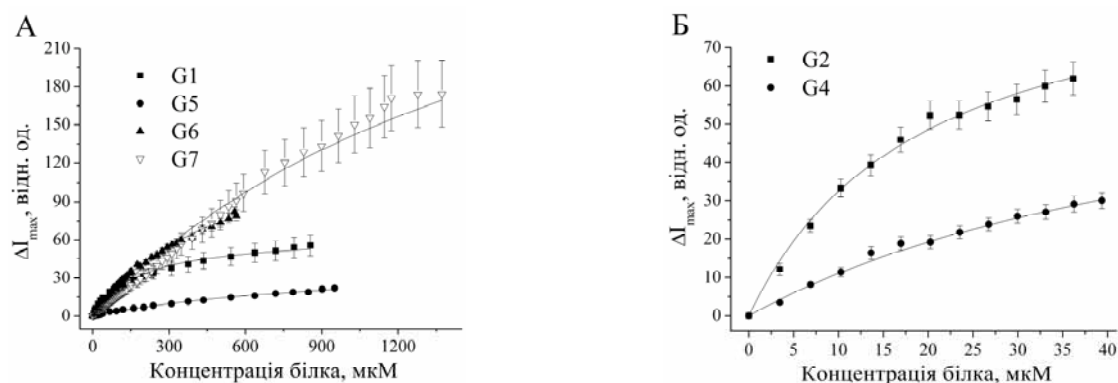


Рисунок 3.20. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з нативним лізоцимом, отримані шляхом титрування зонда білком. Концентрації зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7: 0.04, 0.63, 0.85, 0.05, 0.1 мкМ, відповідно

Таблиця 3.7

Характеристики зв'язування нових сквараїнових зондів з нативним лізоцимом та з фібрилами лізоциму F_{ac}

Нативний лізоцим										
Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	α , мкМ ⁻¹	I/I_0	λ_0 , нм	λ_{em}^{LzN} , нм	Q	Q_0	ΔG , кДж/моль	$ГД$, мкМ
G1	0,017	0,32	1491±150	1,8	658	664	0,17	0,032	-24	34
G2	0,054	0,99	151±15	1,5	655	663	0,03	0,011	-26	58
G4	0,042	0,43	86±9	1,5	652	661	0,14	0,028	-26	41
G5	0,005	0,17	268±27	1,7	582	552	0,026	0,0015	-21	33
G6	0,003	0,76	2733±27	1,8	643	652	0,14	0,014	-25	4,3
G7	0,001	0,46	4817±48	2,2	642	655	0,21	0,005	-23	4,5
ThT	0,023	0,23	154±15	1,4	489	486	0,072	0,0008	-24	57
Фібрили лізоциму F_{ac}										
	I/I_{nat} λ_{em}^{LzF}									
G1	2,5	0,015	457±46	1,7	0,8	680	0,11	0,032	-36	88
G2	2,5	0,009	1692±170	4,1	2	677	0,14	0,011	-36	2,3
G4	3,5	0,013	918±92	7,4	3,7	674	0,08	0,028	-37	0,9
G5	0,4	0,093	1020±102	39	19,5	542	0,03	0,0015	-31	0,2
G6	57	0,02	3700±370	90	11	662	0,13	0,014	-43	0,07
G7	33	0,028	3707±371	35	17,6	656	0,12	0,005	-42	0,02
ThT	0,8	0,049	3700±370	30	15	484	0,058	0,0008	-33	0,2
G6 _{Facs}	25	0,024	6368±640	133	25	667	0,22	0,032	-41	0,04
G7 _{Facs}	7,6	0,032	4300±430	180	33	658	0,23	0,011	-39	0,02

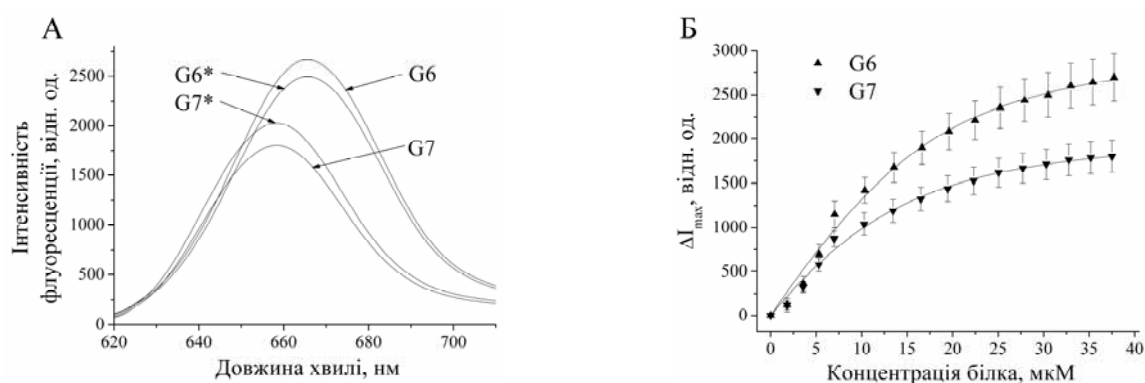


Рисунок 3.21. Спектри флуоресценції зондів G6 та G7 (0,5 мкМ) у F_{acs} (38 мкМ) (А) та ізотерми зв'язування з F_{acs} , отримані шляхом титрування зонда (0,5 мкМ) білком (Б) Концентрації зондів G6*, G7* (білка) були 0,7(18), 1,1(18) мкМ, відповідно (А)

нативними альбуміном, трипсиногеном, β -лактоглобуліном [307]. Таким чином, при низьких концентраціях білка (до 150 мкМ) флуоресценція зонда зростає лише за наявності амілоїдних фібрил. G5, G6, G7 показали максимальні значення квантового виходу відносного зростання інтенсивності та вибіркової чутливості до фібрил лізоциму (у порівнянні з нативним білком). На основі отриманих параметрів побудували ряди падіння специфічності сквараїнів до фібрил лізоциму.

Фінальний ряд: G6, G7 \rightarrow G5 \rightarrow ThT \rightarrow G4 \rightarrow G2 \rightarrow G1.

Таким чином, зонди G6, G7, G5 виявились найбільш чутливими до фібрил лізоциму, тоді як ThT мав нижчу специфічність до фібрил завдяки у 2–3 рази нижчим значенням квантового виходу та на порядок нижчій константі асоціації, ніж у G6, G7. Ці результати узгоджуються з результатами, отриманими при тестуванні бензантронових зондів, що теж мали вищу чутливість до F_{ac} , ніж ThT.

Доцільним було також визначити чутливість кращих сквараїнів, G6 та G7, до F_{acs} і порівняти властивості бензантронових та сквараїнових зондів. На рис. 3.21, 3.22 зображено спектри флуоресценції, ізоТЕРМИ зв'язування і графіки Скетчарда G6, G7 з фібрилами F_{acs} , а параметри зв'язування наведено у таблиці

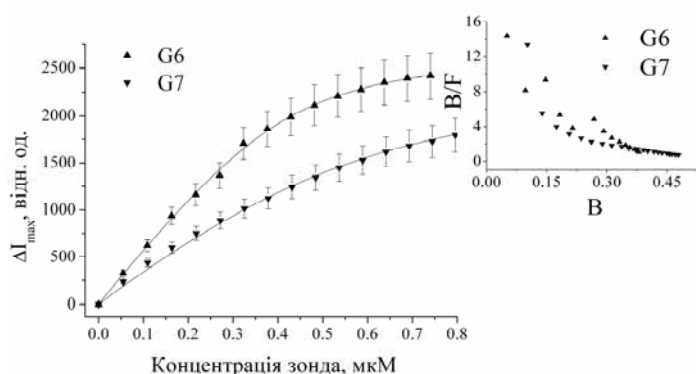


Рисунок 3.22. ІзоТЕРМИ зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами лізоциму F_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом. Концентрація лізоциму – 18 мкМ

3.7, $\Delta\lambda$) була нижча у F_{acs} (G6). Однак, K_a зондів вищі у F_{ac} , а n схожі у F_{ac} та F_{acs} , що дивно, бо F_{ac} мають нижчий модуль еластичності (F_{ac} , певне,

3.7. Зонди виявились чутливими до морфології фібрил: у присутності F_{acs} вони мали у ~2–6 разів вищі значення параметрів I/I_0 та I/I_{nat} , у 2 рази більші значення квантового виходу (G6, G7) та $ГД$ (G6), ніж у присутності F_{ac} . Полярність сайтів зв'язування (таблиця

сформовані з одного протофіламента, а F_{acs} – з двох) та вищу полярність [270]. Зокрема, жорсткість сайтів зв'язування сприяє іммобілізації бензантронів у структурі фібрили і підвищує їх квантовий вихід (розділ 3.1.1, фібрили F_{acs}), якщо вона не настільки висока, що зменшує ширину та глибину жолобка і перешкоджає зв'язуванню зонда (розділ 3.1.2, фібрили Ins_{acs}). У випадку громіздких сквараїнів, певне, висока щільність пакування протофіламентів F_{acs} уже перешкоджає зв'язуванню зондів із жолобками (через їх більші просторові розміри у порівнянні з бензантронами) та призводить до зниження K_a . Це підтверджується появою додаткових сайтів зв'язування G6, G7 з F_{acs} у порівнянні з F_{ac} , тому загальна стехіометрія зв'язування (розрахована за допомогою мономодальної моделі) зондів з фібрилами F_{acs} не знижується у порівнянні з F_{ac} . З іншого боку, зростання квантового виходу у F_{acs} у порівнянні з F_{ac} означає їх високу чутливість до зниження полярності та зростання в'язкості оточення. Поведінка ThT протилежна до сквараїнів, бо його геометричні розміри не заважають зв'язуванню з жолобками F_{acs} . Тому зонд має два типи сайтів на F_{ac} (як у роботі Кузнецової), і лише один тип сайтів зв'язування з F_{acs} (рис. 3.8Б) [154].

Якщо порівняти отримані результати з даними бензантронів, можна зробити наступні висновки: а) положення максимумів і бензантронів, і сквараїнових зондів (G6), і ThT свідчить про меншу полярність сайтів зв'язування F_{acs} , ніж F_{ac} ; б) більші значення квантового виходу бензантронів, сквараїнових зондів, і ThT у присутності F_{acs} означають їх вищу чутливість до F_{acs} , ніж до F_{ac} ; в) константи асоціації на порядок вищі (зонди цвіттеріонні), а квантовий вихід – у 1,3–2 рази нижчий у G6, G7, ніж у бензантронів у присутності F_{acs} (крім IAH, IBH, ISH); г) стехіометрія зв'язування, параметри I/I_0 та I/I_{nam} для сквараїнів у F_{acs} подібні до параметрів бензантронів (крім IAH, IBH, ISH, що мають на порядок вищу стехіометрію зв'язування); д) $ГД$ фібрил у сквараїнів у F_{acs} на порядок нижча, ніж у бензантронів (крім IAH, IBH, ISH, що їх $ГД$ на порядок нижча, ніж у решти барвників). Цікаво, що просторові розміри сквараїнів більші, ніж у бензантронів, але це не призводить до зниження параметра n через появу додаткових сайтів зв'язування сквараїнів

з F_{acs} . Таким чином, зонди обох класів мають дуже високу специфічність до фібрил лізоциму.

Фінальний ряд падіння чутливості зондів п'яти барвників до фібрил F_{acs} : $G6 \rightarrow ThT \rightarrow ABM \rightarrow G7 \rightarrow NR$. Виявилось, що $G6$ більш специфічний до амілоїдних фібрил лізоциму, ніж ABM та ThT . З іншого боку, зонди $G6$ та IAN мають схожі параметри I/I_0 , Q та $ГД$, тобто приблизно однакову чутливість до F_{acs} .

На наступному етапі роботи визначали чутливість сквараїнових барвників до фібрил інсуліну. На рис. 3.23 наведено спектри флуоресценції зондів, отримані при титруванні зонда $G6$ білком. Ізотерми зв'язування зондів проілюстровані на рис. 3.24 та 3.25А, а параметри зв'язування – у таблиці 3.8. На рис. 3.25Б видно нелінійні, ввігнуті донизу графіки Скетчарда флуорофорів $G6$, ThT . Зростання квантового виходу флуоресценції барвників і довгохвильові зсуви максимумів флуоресценції зондів (таблиця 3.8, λ_{em}^{InsF}) свідчать про збільшення жорсткості та зниження полярності оточення, як і у випадку фібрил лізоциму. На основі отриманих параметрів побудували ряди падіння специфічності сквараїнів до фібрил інсуліну Ins_{ac} .

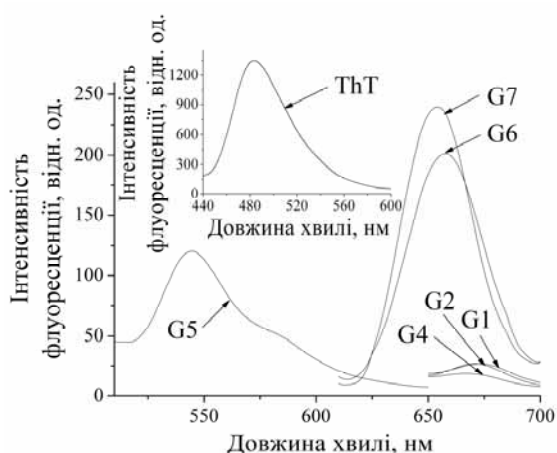


Рисунок 3.23. Спектри флуоресценції $G1$, $G2$, $G4$, $G5$, $G6$, $G7$ у присутності Ins_{ac} . Концентрації зондів (білка) становили: 0,01 (38), 0,01 (34), 0,02 (42), 0,1 (28), 0,043 (112), 0,043 (112), 0,22 (55) мкМ, відповідно

Фінальний ряд: $ThT \rightarrow G6 \rightarrow G7 \rightarrow$

$G4 \rightarrow G2 \rightarrow G1 \rightarrow G5$.

Таким чином, зонд ThT виявився більш специфічним до фібрил Ins_{ac} , ніж сквараїнові барвники, що свідчить про його високу чутливість саме до фібрил інсуліну [87]. Зонди $G6$, $G7$ займають другу та третю позиції, і першу – серед решти сквараїнів, як і у випадку фібрил F_{ac} , тобто вони найбільш чутливі до обох типів фібрил. Також $G6$, $G7$ є більш стабільними, ніж інші сквараїнові барвники (можливо, завдяки більшому опору до нуклеофільних атак). У свою

чергу, довгі вуглеводневі хвости донорів у молекулах $G1$ та $G2$ викликають

зниження їх асоціації з фібрилами Ins_{ac} та F_{ac} завдяки стеричним обмеженням (громіздкі замісники знижують планарність зонда і це знижує їх здатність до зв'язування з фібрилами [301]), хоча наявність таких хвостів підвищує афінність до нативного білка [217]. Дійсно, двогранні кути між довгими вуглеводневими замісниками у тіазоловій (нафталеновій) частині молекули донора та центральним кільцем циклобутану перевищували 90° , що показала оптимізація геометрії. Таким чином, завдяки високій ширині G1 та G2 їм важко проникати у жолобки амілоїдних фібрил. G4 може мати вищу чутливість до білка, ніж решта зондів, через нижчий Д–А–Д характер, що підвищує енергетичний бар'єр для формування планарної структури флуорофорів при їх інкорпорації у фібрили [207,239].

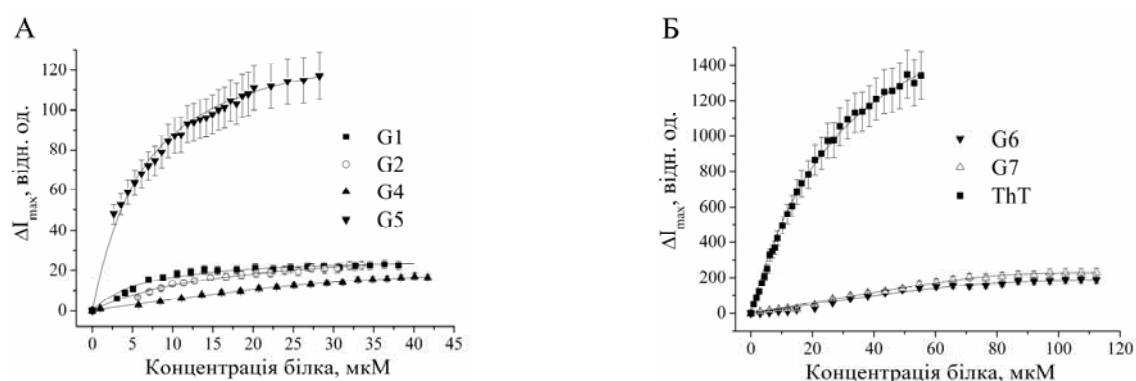


Рисунок 3.24. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами інсуліну Ins_{ac} , отримані шляхом титрування зонда білком. Концентрації зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7: 0.01, 0.01, 0.02, 0.1, 0.043, 0.043, 0.22 мкМ, відповідно

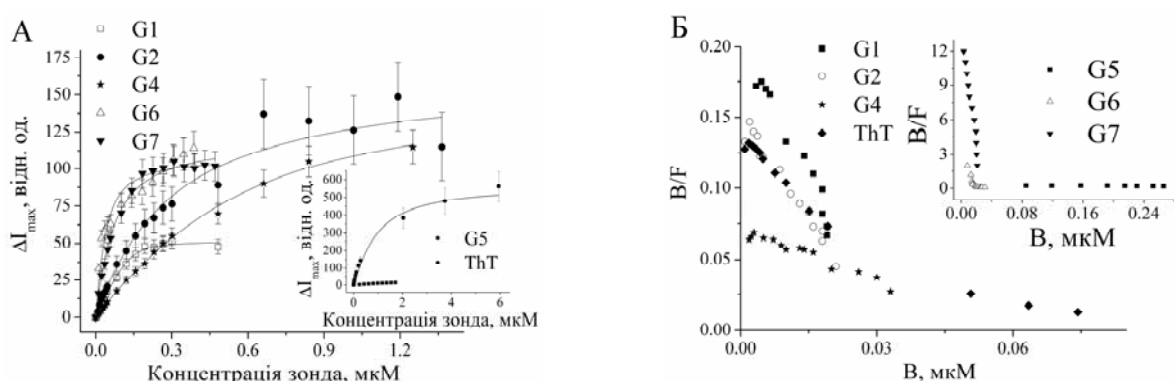


Рисунок 3.25. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами інсуліну Ins_{ac} , отримані шляхом титрування білка зондом (A) та залежності експериментального відношення «зв'язаний зонд/вільний зонд» (B/F) від фракції зв'язаного зонда (B). Концентрації білка: 4, 4, 4, 4, 24, 12, 4 мкМ для зондів G1, G2, G4, G5, G6, G7, ThT, відповідно

Характеристики зв'язування нових сквараїнових зондів з фібрилами інсуліну Ins_{ac}

Зонд	K_a , мкМ ⁻¹	n	α , мкМ ⁻¹	I/I_0	λ_{em}^{InsF} , нм	Q	ΔG , кДж/моль	$ГД$, мкМ
G1	0,28	0,5	2738±275	7	674	0,1	-31	0,6
G2	0,08	0,76	4067±410	15	671	0,033	-27	0,5
G4	1,3	0,016	4413±440	191	666	0,026	-34	0,7
G5	0,3	0,8	46±5	4	545	0,009	-31	1,1
G6	0,6	0,1	7758±780	131	658	0,625	-32	0,05
G7	0,13	0,1	10480±1110	156	654	0,326	-29	0,1
ThT	0,2	0,16	7556±780	396	485	0,130	-30	0,025
G6 _{INSacs}	105	0,008	4808±480	83	658	0,120	-45	0,034
G7 _{INSacs}	11	0,009	6500±650	100	656	0,130	-39	0,04

Тепер розглянемо чутливість кращих маркерів, G6 та G7, до фібрил інсуліну Ins_{acs} . На рис. 3.26 та 3.27 зображено спектри флуоресценції, ізотерми зв'язування та графіки Скетчарда, отримані при вивченні зв'язування зондів з фібрилами Ins_{acs} . Максимуми флуоресценції сквараїнів у присутності Ins_{ac} та Ins_{acs} були однакові, що свідчить про однакову полярність сайтів зв'язування зондів з цими фібрилами.

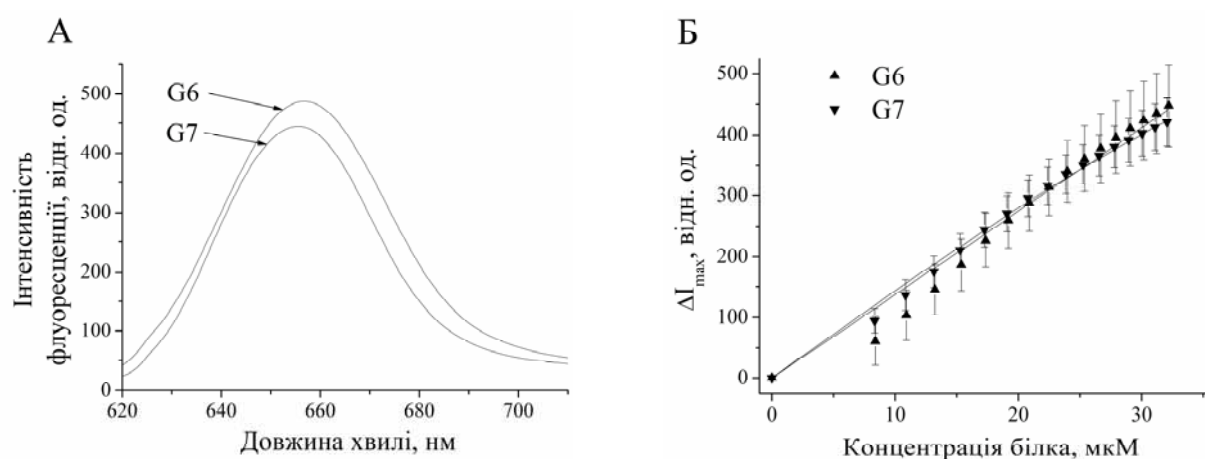


Рисунок 3.26. Спектри флуоресценції зондів G6 та G7 у присутності фібрил Ins_{acs} (А) та ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами інсуліну Ins_{acs} , отримані шляхом титрування зонда білком (Б). Концентрації зондів G6, G7 та білка: 0,1 та 32 мкМ, відповідно (А). Концентрації зондів – 0,1 мкМ (Б)

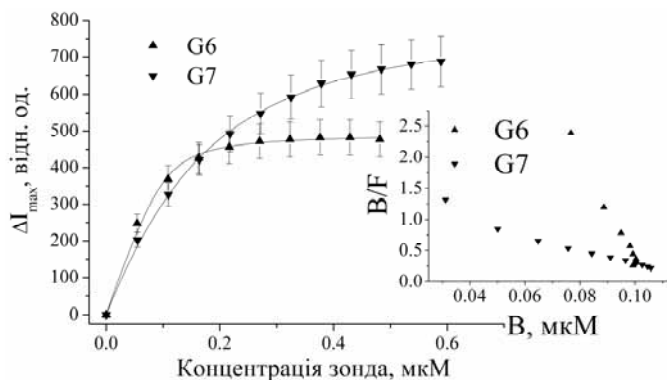


Рисунок 3.27. Ізотерми зв'язування сквараїнових барвників з фібрилами інсуліну Ins_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом. Концентрація інсуліну – 13 мкМ

З таблиці 3.8 видно, що G6, G7 мають на 2 порядки вищі значення K_a , на порядок нижчі значення n , на ~50 % нижчі значення α , та I/I_0 , нижчі значення $ГД$ та у ~3–6 раз нижчі значення квантового виходу у Ins_{acs} , ніж у Ins_{ac} . Цікаво, що цвіттеріонний G6 мав вищі K_a у F_{ac} , F_{acs} , Ins_{ac} , Ins_{acs} , ніж G7, що

свідчить про суттєву роль гідрофобних (ароматичних), а не електростатичних взаємодій у зв'язуванні барвників із жолобками фібрил. Крім того, наявність SO_3^- групи у молекулі сквараїнів призводило, наприклад, до зниження K_a та n з бичачим сироватковим альбуміном [207]. З іншого боку, CR має сульфатну групу, як і G7, і його висока специфічність до β -структури полі-L-лізину корелює з поверхневою густиною заряду білка (що зростає зі зниженням pH) [116]. G7 має більше ароматичних груп, ніж CR, а тому гідрофобні (ароматичні) зв'язки з фібрилами, вочевидь, відіграють головну роль. Висока роль гідрофобних, а не електростатичних зв'язків при зв'язуванні сквараїну SQ-1 з фосфоліпідними мембранами та нативним лізоцимом також показана у роботі В.М. Іоффе [214]. Вище значення параметра n сквараїнів у Ins_{ac} можна пояснити більшим діаметром фібрил (~20 нм) у порівнянні з Ins_{acs} (діаметр яких складає ~12 нм). Діаметр Ins_{ac} відповідає приблизно двом протофіламентам [300], однак для фібрил інсуліну він залежить від способу отримання агрегатів (наприклад, для фібрили з двох протофіламентів діаметр може бути 10–50 нм) [198,308]. Ins_{ac} може мати більшу кількість β -листів у протофіламенті та вищу щільність їх пакування. Іншими словами, *модуль еластичності* фібрил Ins_{ac} вищий, ніж Ins_{acs} , що дозволяє більшій кількості молекул зонда зв'язатися з жолобками [270]. Таким чином, аналізуючи стехіометрію зв'язування зондів G6 та G7 з фібрилами інсуліну, можна зробити висновок про діаметр фібрил.

Оскільки полярність сайтів зв'язування Ins_{acs} та Ins_{ac} приблизно однакова, то зростання квантового виходу флуоресценції та інших параметрів у Ins_{ac} означає високу чутливість сквараїнів до в'язкості оточення.

На відміну від АВМ, що мав два типи сайтів зв'язування з фібрилами Ins_{acs} , G6, G7 мають лише один тип сайтів. Також G6 асоціює лише з одним типом сайтів зв'язування Ins_{acs} у порівнянні з Ins_{ac} (рис. 3.25Б). G6 та ThT мають гетерогенні сайти зв'язування з Ins_{ac} , що призводить до додаткового зростання параметра n у Ins_{ac} . Крім того, зростання діаметра фібрил Ins_{ac} призводить до наближення параметра n ThT до теоретично розрахованого (0.22) [1]. Електростатичне відштовхування може заважати G7 зв'язуватись з неспецифічними сайтами Ins_{ac} . Імовірно, Ins_{acs} не має додаткових сайтів для сквараїнів через їх більші геометричні розміри, ніж у АВМ.

Цікавим є порівняти чутливість сквараїнів та бензантрону АВМ до Ins_{acs} . Цвіттеріонні зонди G6 та G7 мали на 1–2 порядки більші значення K_a , ніж АВМ у присутності Ins_{acs} ; на порядок вищі значення n ; нижчі значення квантового виходу; вищі значення I/I_0 , ніж у АВМ; у ~ 2 –100 раз нижчі значення ΓD , ніж у решти зондів. Значне зростання константи асоціації сквараїнів при переході з Ins_{ac} до Ins_{acs} можна пояснити лише чутливістю цього параметра до в'язкості оточення.

Фінальний ряд падіння специфічності барвників до фібрил Ins_{acs} : ThT \rightarrow G7 \rightarrow G6 \rightarrow АВМ \rightarrow NR. Таким чином, сквараїни більш чутливі до фібрил інсуліну, ніж бензантрони. Ця тенденція менш виражена у F_{acs} , через зниження полярності та в'язкості оточення. Тому вона можлива, передусім, завдяки більшій чутливості сквараїнів до в'язкості оточення, порівняно з бензантронами. Подібні (і навіть вищі) значення Q у сквараїнів, ніж у ThT, підтверджують цю гіпотезу. Цікаво, що більш ароматичні сквараїни менш чутливі до полярності оточення, ніж бензантрони. Так, G7, наприклад, має нижчий Q у F_{acs} , ніж АВМ. Однак, обидві групи зондів мають вищу специфічність, ніж класичний зонд NR.

На наступному етапі роботи порівнювали чутливість сквараїнів та бензантронів до фібрил інсуліну та лізоциму. Максимуми флуоресценції сквараїнових барвників (крім G5) були зсунуті у сторону більших значень довжин хвиль у лізоцимі на 2–9 нм, ніж у присутності фібрил інсуліну (таблиця 3.8, λ_{em}^{LzF} та λ_{em}^{InsF}) [216,217]. Це означає, що сайти зв'язування сквараїнів з фібрилами лізоциму більш гідрофобні, ніж з інсуліном, що підтверджується літературними даними [87]. G6 та G7 мають на 1–3 порядки нижчі значення параметрів K_a , у 2–3 рази вищі значення n , а також у ~ 2 рази більші значення параметра α у присутності Ins_{ac} , ніж у F_{ac} . Квантовий вихід флуоресценції G6, G7 у присутності Ins_{ac} був у ~ 2 рази вищий, ніж у присутності F_{ac} . ThT мав у 4 рази більше значення n , I/I_0 , та на 2 порядки більше значення α у присутності F_{ac} , ніж у присутності Ins_{ac} . Тобто специфічність до Ins_{ac} вища, ніж до F_{ac} . Це означає, що значення *жорсткості згинання* фібрил (що нижче для F_{ac} через нижчу кількість протофіламентів у фібрилі), або ступеня іммобілізації зондів G6, G7, обернено корелює з їх чутливістю до наявності фібрил. З іншого боку, G5 виявив вибіркочну чутливість до фібрил лізоциму. Зокрема, він мав на порядок більше значення n , I/I_0 , та на 2 порядки більше значення α у присутності F_{ac} , ніж у присутності Ins_{ac} . Вищі значення квантового виходу G5 у присутності F_{ac} можна пояснити сильнішими гідрофобними взаємодіями, ніж у Ins_{ac} . Параметри α , n , I/I_0 , та $ГД$ були вищі для G1, G2, G4 у присутності Ins_{ac} , ніж у F_{ac} . Менший розмір жолобків F_{ac} , що ускладнює зв'язування барвників з агрегатами білка, у випадку різної кластеризації β -листів фібрил F_{ac} та Ins_{ac} (як у випадку порівняння F_{ac} та F_{eth} , розділ 3.1.2) може бути причиною зниження стехіометрії зв'язування зондів при переході з Ins_{ac} до F_{ac} . Нижчі значення K_a сквараїнів у присутності Ins_{ac} можна пояснити чутливістю цього параметра до полярності оточення. Також, ароматичними та стеричними взаємодіями зондів з фібрилами можна пояснити їх більшу афінність до фібрил лізоциму, ніж у тіофлавіну Т (таблиця 3.8). Крім того, карбоксильні групи білка можуть формувати галогенний зв'язок з бромом G6 та G7 [302]. Можуть формуватися і водневі зв'язки між карбонільною групою циклобутану та атомом сірки бензотіазольного кільця зонда з аміно- чи карбоксильними групами пептидного остову [217].

Нарешті, порівняємо чутливість сквараїнів до Ins_{acs} та F_{acs} . Параметр K_a для G6 нижчий у 3 рази, а n G6, G7 вищі у ~ 3 рази у лізоцимі (фібрили F_{acs}

мають більший діаметр, ніж Ins_{acs} – 17 та 12 нм, відповідно і певне, менш щільно упаковані протофіламенти, або *нижчий модуль еластичності*); I/I_0 , $ГД$ для G7 нижчі у 2 та 3 рази у лізоцимі; I/I_0 G6 вищий на 67% у лізоцимі, а Q – приблизно у 2 рази вищий у лізоцимі. Квантовий вихід G6 більший у F_{acs} через вищу полярність та нижчу жорсткість фібрил (що дозволяє зв'язатись зондам з жолобками). Нижчою жорсткістю можна пояснити і падіння K_a у F_{acs} . Таким чином, G6 більш специфічний до фібрил лізоциму F_{acs} , ніж до інсуліну Ins_{acs} . Більш щільний ступінь пакування протофіламентів (або менший розмір жолобка у випадку F_{ac}) у Ins_{acs} , F_{ac} у порівнянні з Ins_{ac} , F_{acs} , відповідно, а також F_{acs} у порівнянні з Ins_{ac} , призводить до нижчих значень стехіометрії зв'язування зонда G6, і нижчої чутливості зонда до фібрил (квантового виходу та інших термодинамічних параметрів). Цікаво, що і G6, і АВМ мають вищу стехіометрію зв'язування з F_{acs} , ніж з Ins_{acs} . Таким чином, про щільність пакування протофіламентів (або розміри жолобків) у фібрилах можна судити за даними кращих зондів обох класів.

Фінальний ряд падіння специфічності зонда G6 до фібрил є таким (з урахуванням параметрів I/I_0 , Q , $ГД$): $F_{acs} \rightarrow Ins_{ac} \rightarrow Ins_{acs} \rightarrow F_{ac}$. Отже, у найбільшій мірі зонд G6 розрізняє F_{acs} та F_{ac} , а зонд G7 майже не розрізняє ці типи фібрил.

За допомогою G6 показано також, що полярність фібрилярних сайтів зв'язування спадає у ряду: Ins_{ac} , $Ins_{acs} \rightarrow F_{ac} \rightarrow F_{acs}$, тобто барвник має найбільшу чутливість до менш полярних фібрил, що свідчить про значну роль гідрофобних взаємодій «зонд-фібрила». Також зауважимо, що максимум флуоресценції G6 більш чутливий, ніж АВМ до різниці у полярності фібрил F_{acs} та Ins_{acs} .

Таким чином, нові сквараїни G6 та G7 можна рекомендувати для детектування амілоїдних фібрил у ближній інфрачервоній області, завдяки їх високій чутливості до фібрил лізоциму та інсуліну та великим коефіцієнтам екстинкції [302]. Більш того, можливість детектування фібрил *in vivo* для ФДТ є потенційною областю їх використання, оскільки вони не є токсичними для біологічних систем (що є їх перевагою над бензантронами) [310]. Перевагою їх над бензантронами є вища афінність (та квантові виходи) до амілоїдних фібрил за рахунок цвіттеріонної структури та вищої чутливості до в'язкості оточення, а

також на порядок вищі значення $ГД$. Недоліками цих барвників у порівнянні з бензантроннами є низька розчинність в етанолі, нижча стабільність у буфері та менші значення Стоксових зсувів [218,311].

3.1.5. Похідні тіофлавіну T і фібрили лізоциму та інсуліну, отримані за умов кислотної денатурації

Для дослідження впливу різних замісників у бензотіазольному фрагменті зонда на спектральні властивості та афінність до амілоїдних фібрил похідних ThT, були визначені параметри зв'язування позитивно заряджених похідних ThT з фібрилами F_{acs} та Ins_{acst} (розділ 2.2). Типові спектри флуоресценції зондів у вільному стані та у присутності фібрил представлені на рис. 3.28. Вставки до рисунків та таблиця 3.9 показують, що «флуоресцентна відповідь» ThT ($I_{Insacst} / I_0$ або I_{Facs} / I_0) у присутності амілоїдних фібрил у ~6–116 раз вища у порівнянні з його похідними. Максимуми флуоресценції зондів у лізоцимі зсунуті на 5–13 нм у сторону коротших довжин хвиль (таблиця 3.9, $\lambda_{em}^{Insacst}$ та λ_{em}^{Facs}), що підтверджує нижчу полярність агрегатів лізоциму. Цікаво, що ICT4 та ICT5 показали найвищі значення квантового виходу у буфері та відсутність «флуоресцентної відповіді» у присутності амілоїдних фібрил (таблиця 3.9, Q_0).

Параметри зв'язування барвників ICT2, ICT3, ThT з фібрилами отримували за допомогою титруванні зонда білком та білка зондом (рис. 3.29).

Похідні ThT мають зв'язуватися із жолобками фібрил, подібно до ThT, про що свідчать високі значення K_a та Q (крім Q для ICT2 в F_{acs}) (таблиця 3.10). Константи асоціації ICT2, ICT3 з лізоцимом були вищі, ніж з інсуліном, можливо, завдяки більшій гідрофобності (ароматичності) жолобків [114]. Цікаво, що електростатичні взаємодії не впливають на значення K_a нових зондів, що також видно з їх аналізу для ThT. Цікаво, що хоча Ins_{acst} та Ins_{acs} мають схожу морфологію [197], але параметри зв'язування ThT з амілоїдними фібрилами обох типів відрізняються, тобто зонд реагує на відмінності у вторинній структурі фібрил.

Крім того, «флуоресцентні відповіді» ICT2, ICT3, ThT були у 5–8 разів вищі до Ins_{acs} ($I_{Insacst} / I_0$), ніж до F_{acs} (I_{Facs} / I_0) (таблиця 3.9). Квантові виходи

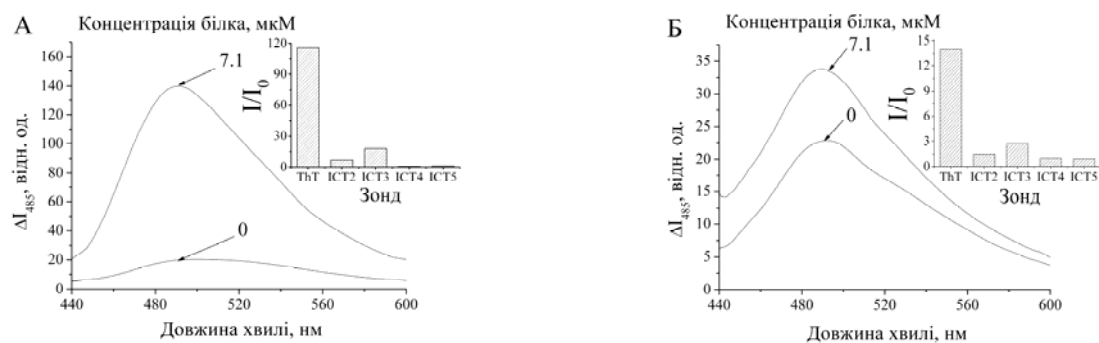


Рисунок 3.28. Спектри флуоресценції ICT2 у присутності фібрил Ins_{acs} (А) та F_{acs} (Б). У вставках – відносне зростання інтенсивності флуоресценції похідних ThT у присутності фібрил Ins_{acs} (А) та F_{acs} (Б). Концентрації білка та зондів: 7,1 та 5 мкМ, відповідно

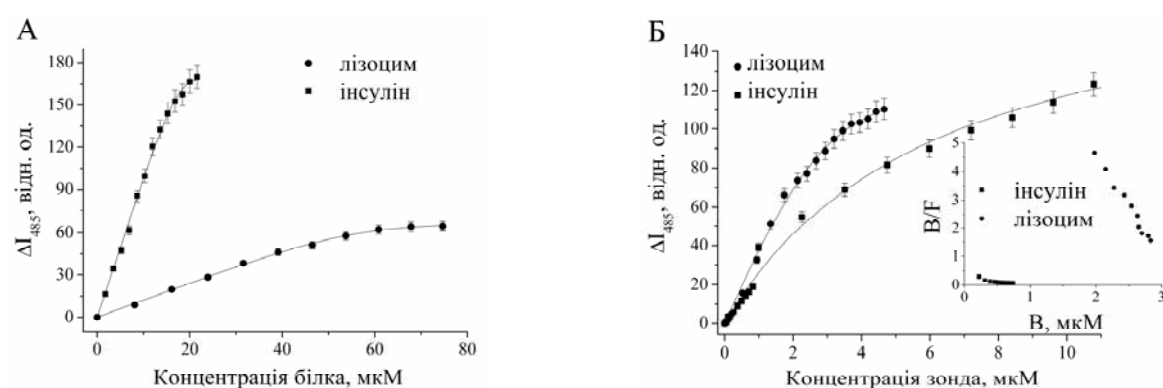


Рисунок 3.29. Ізотерми зв'язування ICT2 з фібрилами лізоциму F_{acs} та Ins_{acst}, отримані шляхом титрування зонда білком (А) та білка зондом (Б). Концентрації зонда – 1,8 та 1 мкМ у F_{acs} та Ins_{acst}, відповідно (А). Концентрації лізоциму, інсуліну: 16, 22 мкМ, відповідно (Б). У вставці – залежність відношення «зв'язаний зонд: вільний зонд» від концентрації вільного ICT2 у присутності Ins_{act} (Б)

Таблиця 3.9

Спектральні властивості похідних ThT у буфері та у присутності фібрил F_{acs} та Ins_{acs}

Зонд	λ_0 , нм	$\lambda_{em}^{Insacst}$, нм	λ_{em}^{Facs} , нм	Q_0 *10 ⁴	$I_{Insacst}/I_0$	I_{Facs}/I_0	I_{GL}/I_{DMF}	I_{DCM}/I_{DMF}	I_{GL}/I_{DCM}
ThT	489	488	482	1	116	14,0	99	7,2	14,0
ICT2	497	497	484	7	7	1,5	12	1,7	7,4
ICT3	497	487	488	4	18	2,7	57	6,6	9,0
ICT4	439	428	428	3880	0,7	1,0	1	0,8	1,2
ICT5	398	410	426	950	1,0	0,94	1,9	1,2	1,6

Характеристики зв'язування похідних ThT з фібрилами F_{acs} та Ins_{acst}

Білок	Зонд	K_a , мкМ^{-1}	n	α , мкМ^{-1}	I/I_0	Q	ΔG , кДж/ моль	$ГД$, мкМ
Ins_{acst}	ThT	1,80	0,005	6119	56	0,65	-35	0,03
	ICT2	0,06	0,245	176	3,5	0,14	-28	7
	ICT3	0,11	0,057	1014	6	0,27	-28	4,2
F_{acs}	ThT	0,5	0,02	7439	99	0,5	-32	0,16
	ICT2	0,8	0,26	39	2,2	0,003	-33	8,2
	ICT3	3,1	0,02	208	4	0,02	-36	3,2

зондів були приблизно на порядок вищі в інсуліні, ніж у лізоцимі (таблиця 3.10, Q_0). Це означає специфічність похідних ThT саме до інсуліну і узгоджується з попередніми дослідженнями чутливості ThT та NR до амілоїдних фібрил [87,299].

Фінальні ряди падіння специфічності зондів до фібрил Ins_{acst} (отримані за допомогою параметрів I/I_0 , Q та $ГД$): ThT \rightarrow ICT3 \rightarrow ICT2.

Фінальні ряди падіння специфічності зондів до фібрил F_{acs} : ThT \rightarrow ICT2 \rightarrow ICT3. Таким чином, ThT має найвищу специфічність до амілоїдних фібрил обох білків. Зауважимо, що IC2, ICT3 мають вибіркову специфічність до Ins_{acst} , бо їх квантовий вихід зростає приблизно на порядок при переході з F_{acs} до Ins_{acst} . Також похідні ThT виявилися найменш чутливими до фібрил F_{acs} та Ins_{acst} у порівнянні зі скварайнами та бензантронами.

Таким чином, на квантовий вихід флуоресценції ThT та його похідних впливає в'язкість оточення, оскільки Q був значно вищий у більш полярних та жорстких фібрилах інсуліну [299]. З іншого боку, за наявності дуже жорстких фібрил Ins_{acs} ThT має низьке значення Q (розділ 3.1.3). Зростанню квантового виходу ThT та його похідних не завадило зниження K_a чи n у Ins_{acst} відносно F_{acs} . Отже, Ins_{acst} сильніше обмежує внутрішньомолекулярне обертання зондів, ніж F_{acs} . З огляду на це, ICT2, ICT3 можна використовувати для детектування фібрил різної в'язкості.

Графіки Скетчарда для ICT2 нелінійні у присутності Ins_{acst} , тобто при щільному пакуванні протофіламентів білка (фібрили інсуліну мають вищий модуль еластичності) зонд зв'язується з неспецифічними сайтами (рис. 3.29Б). Таким чином, за допомогою ICT2, G6 та АВМ можна оцінювати щільність пакування протофіламентів у фібрилах Ins_{acs} (Ins_{acst}): менші значення n викликані меншою товщиною агрегатів білка (сильнішими взаємодіями між протофіламентами), а нелінійність графіків Скетчарда свідчить про появу додаткових сайтів зв'язування через слабку доступність основних сайтів.

Цікаво проаналізувати, чому нові зонди не мають кращої чутливості до фібрил, ніж ThT. Це може бути пов'язане з різними фотофізичними властивостями барвників. Зокрема, більш сильна флуоресценція зондів (особливо ICT4, ICT5) у буфері може бути ініційована: а) вищим бар'єром для внутрішньомолекулярного обертання зі стану LE до TICT [138]; б) енергетичні рівні стану LE лежать нижче, ніж рівні стану TICT, що стабілізує перший стан і попереджає формування другого. У першому випадку стеричні взаємодії та високі дипольні моменти основного стану можуть знизити внутрішнє обертання донорних та акцепторних груп зонда і призвести до високих значень квантового виходу ICT4 у буфері (таблиця 3.9, Q_0) [312]. У другому випадку через зниження донорної та акцепторної сил формується флуоресцентний стан LE, а не стан TICT [313,314]. Дійсно, нижчі донорні сили морфоліно- та метокси- замісників фенольного кільця ICT3 та ICT5, відповідно, у порівнянні з діметиламіновою частиною ThT, можуть відповідати за їх більш яскраву флуоресценцію у буфері (через зростання енергії рівня TICT відносно LE). У свою чергу, електрон-донорний метокси-замісник бензотіазольного кільця ICT2, вірогідно, призводить до зростання квантового виходу зонда у буфері відносно ThT [313].

Формування водневих зв'язків між зондами та розчинником [315] або формування ексимерів [112] навряд чи проходить при низьких концентраціях зонда у полярному непротонному розчиннику, а отже, не впливає на

стабільність стану LE або TICT та квантовий вихід флуорофора. Ці припущення перевірені у розділі 5.

3.1.6. Розрахунки параметрів зв'язування нових зондів з фібрилами за допомогою двохсайтової моделі

У попередніх розділах виявлено, що графіки Скетчарда деяких барвників мають нелінійний характер, що свідчить про наявність більш, ніж одного типу сайтів зв'язування зондів на білку. Метою цього розділу було довести, що другий тип сайтів зв'язування не є специфічним. Параметри зв'язування знаходили за методом, описаним у розділі 2.6.1. Отримані параметри наведені у таблиці 3.11.

Таблиця 3.11

Параметри зв'язування нових зондів з фібрилами, отримані за допомогою двохсайтової моделі

Білок	Зонд	$K_{a1}, \mu\text{M}^{-1}$	n_1	$\alpha_1, \mu\text{M}^{-1}$	$K_{a2}, \mu\text{M}^{-1}$	n_2	$\alpha_2, \mu\text{M}^{-1}$	$\chi^2 \cdot 10^{-3}$
InS _{acs}	ABM	0,2	0,02	3000±300	0,02	0,02	1000±100	254
F _{ac}	ThT	0,8	0,04	4500±450	0,02	0,1	1500±150	126
	G2	4	0,05	1692±170	0,13	1	550±60	25
	G4	4	0,005	1100±110	0,2	0,05	200±20	46
F _{acs}	AM18-23	0,05	0,2	785±79	0,01	0,4	75±8	0,7
	A8	0,06	0,3	600±60	0,01	0,9	100±10	123
	IAH	0,2	0,3	550±60	0,01	0,7	50±5	5
	IBH	0,3	0,4	420±40	0,04	0,7	10±1	7
	ISH	0,8	0,5	130±15	0,007	0,9	10±1	2

Можна бачити, що афінність сайтів зв'язування другого типу на порядок нижче, ніж першого. Параметр α_2 також виявився набагато нижчий, а n_2 трохи зріс. Ці результати підтверджують точку зору, що другий тип сайтів не є специфічним, незначно впливає на квантовий вихід зонда, а тому його можна не враховувати при детектуванні амілоїдних фібрил за допомогою бензантронних, скварайнових барвників та ThT. Цікаво, що така поведінка

параметрів K_a та n двох типів сайтів на фібрилах лізоциму узгоджується з результатами, отриманими у роботі Сулатської, згідно з якими зв'язування з неспецифічними сайтами мало впливало на загальний квантовий вихід зонда. Поява афінності до неспецифічних сайтів зумовлена ентропійними ефектами, тоді як афінність до основних сайтів визначається змінами як ентальпії, так і ентропії (обидва процеси – екзотермічні), як показано у роботі М. Гроенінг для ThT і фібрил інсуліну за допомогою ізотермічного калориметричного титрування [1].

3.2. Вивчення фізико-хімічного оточення бензантронів зондів у фібрилах лізоциму за допомогою вимірювань червоного зсуву максимуму флуоресценції та часороздільної флуоресценції

Фізико-хімічні властивості сайтів зв'язування зондів з фібрилами лізоциму, отриманими за умов кислотної денатурації (з шейкінгом чи без нього), або у концентрованому етанольному розчині, визначали на основі вимірювань червоного зсуву максимуму флуоресценції (ЧЗМФ) та часу життя флуоресценції барвників.

ЧЗМФ виникає при зсуві хвилі збудження до червоного краю області поглинання зондів. Цей ефект зумовлений повільною релаксацією розчинника навколо збудженого стану флуорофора, що віддзеркалює обмежену рухливість безпосереднього оточення зонда [92,316]. У випадку флуорофорів, зв'язаних з білком, ЧЗМФ свідчить про обмежену рухливість полярних груп білка і молекул води, зв'язаних з білком, у наносекундному інтервалі (протягом часу життя збудженого стану) [317]. Величину ЧЗМФ розраховували як різницю максимумів флуоресценції зондів, збуджених при: а) 450 та 520 нм у присутності F_{acs} ; б) 450 та 430 нм у присутності F_{eth} ; в) 570 та 500 нм (A4, IAH, IBH, ISH) або 470 та 540 нм (для решти зондів) у присутності F_{acs} та F_{ac} . При цьому концентрація білка відповідала значенню, що забезпечувало максимальний ступінь зв'язування зонда у даній концентрації.

Типові залежності положення спектрів флуоресценції від хвилі збудження у присутності фібрил F_{acs} та F_{ac} наведено на рис. 3.30, 3.31А, відповідно. Для сквараїнів та похідних ThT ефект ЧЗМФ не вимірювали через те, що для цих зондів характерні відносно низьке значення стоксового зсуву

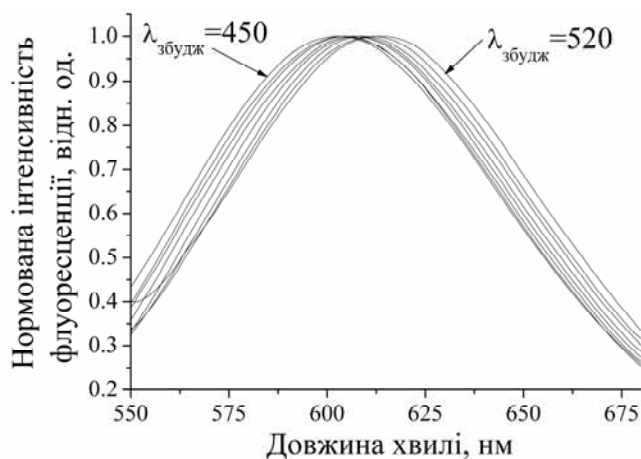


Рисунок 3.30. Спектри флуоресценції АВМ у присутності фібрил F_{acs} . Концентрація зонда становила 0,5 мкМ

– гідрофільна область β -листа [215,322]. Залежності максимумів флуоресценції зондів від довжини хвилі збудження у присутності фібрил F_{ac} та F_{acs} наведені на рис. 3.31Б–Г та 3.32, відповідно. Залежності положення спектрів флуоресценції від хвилі збудження у присутності фібрил F_{eth} наведені на рис. 3.33А, а значення ЧЗМФ для F_{eth} та F_{acs} представлені на рис. 3.33Б та 3.34, відповідно (для F_{eth} та F_{ac} вони також є у таблицях 3.3 та 3.4). Наявність ЧЗМФ також означає присутність розчинника з обмеженою рухливістю у безпосередньому оточенні зонда [92,318].

Спочатку розглянемо ЧЗМФ у фібрилах F_{acs} . Значення ЧЗМФ при збудженні у межах 450–520 нм коливались від 0 до 21 нм (рис. 3.34). З огляду на ці результати, можна розділити бензантрони на 2 групи. До першої групи належать P10, AM4, AM15, AM3, AM18, ІАН, 3АМ39, АМ2-23, АМ12, ІВН, що їх ЧЗМФ був від 0 до 7 нм (майже усі зонди – амідіно похідні бензантроні). До цієї групи можна віднести і NR, що мав ЧЗМФ 6 нм. До складу другої групи входить решта зондів, ЧЗМФ яких коливався від 8 до 21 нм, а середнє значення

(~50 нм) та незначні зміни дипольного моменту при збудженні, тому вони не здатні відчувати цей ефект [318-321]. Крім того, симетричні сквараїни (G1, G2) не можуть зв'язуватися з гідрофобною поверхнею β -листа через значні просторові розміри, а несиметричні – через високі значення дипольних моментів основного стану, а тому для них є лише один сайт локалізації

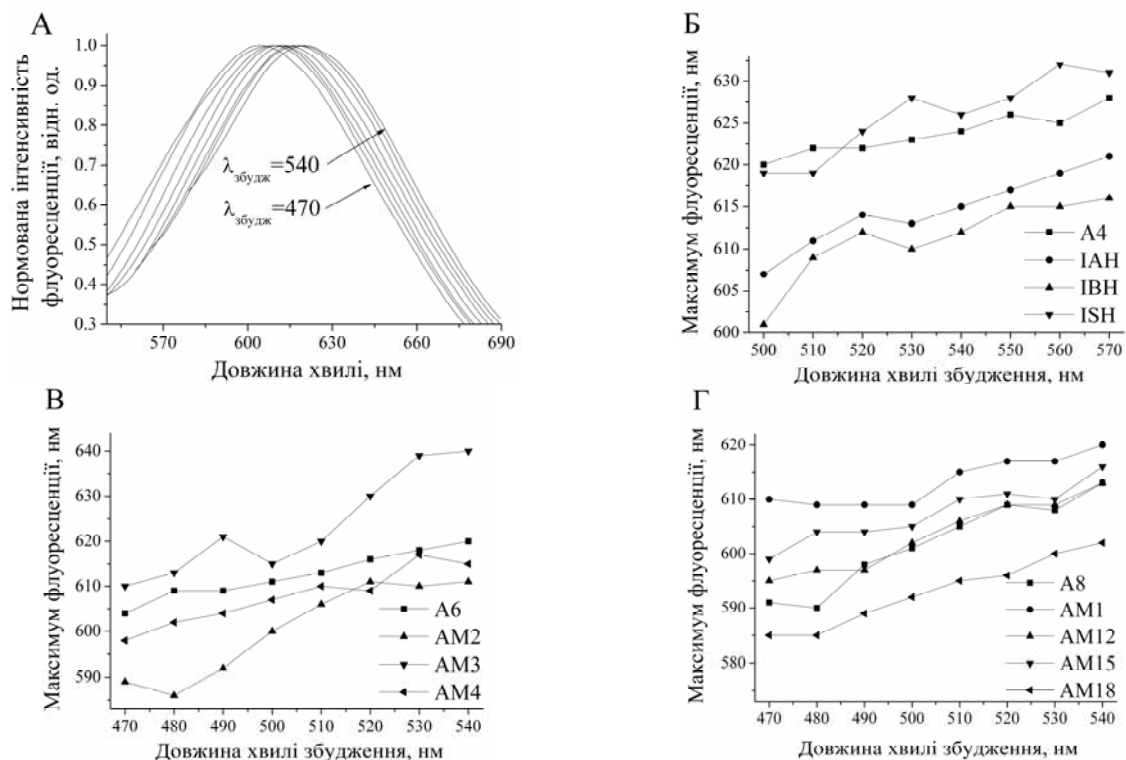


Рисунок 3.31. Спектри флуоресценції А6 у присутності фібрил F_{ac} (А) та залежності максимуму флуоресценції зондів від довжини хвилі збудження у присутності фібрил F_{ac} (Б–Г)

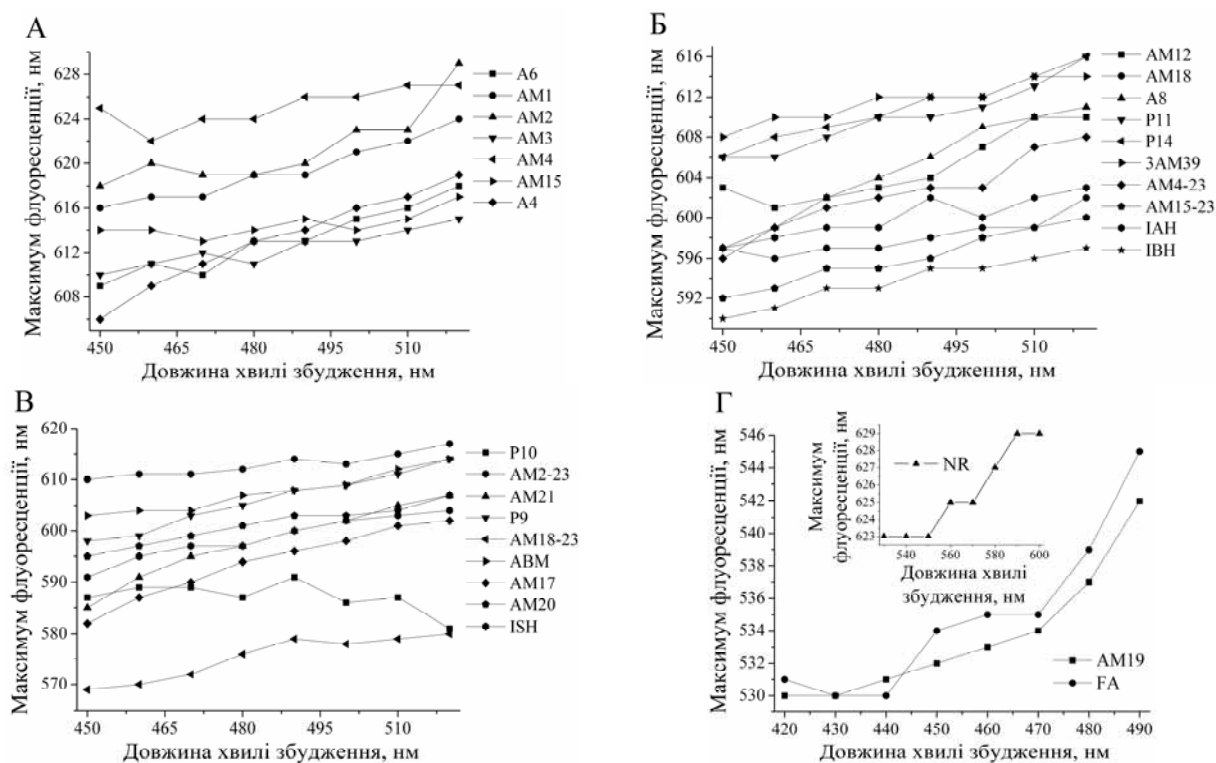


Рисунок 3.32. Залежності максимуму флуоресценції зондів від довжини хвилі збудження у присутності фібрил F_{ac}

ЧЗМФ було ~ 10 нм. Варто зауважити, що різниця у ЧЗМФ може бути викликана як гетерогенністю сайтів зв'язування, так і різними змінами дипольного моменту зонда при збудженні. З цієї причини, щоб підтвердити припущення про те, що на ЧЗМФ подібних за структурою зондів впливають лише характеристики сайтів зв'язування барвників, у даній роботі також було проведено квантово-хімічні розрахунки дипольних моментів барвників. Важливо, що майже усі зонди другої групи мали більш полярні сайти зв'язування, ніж зонди першої групи: їх зсуви максимумів у присутності фібрил відносно буфера становили -63 – 13 нм. При цьому не було кореляції між ЧЗМФ та короткохвильовими зсувами максимумів, тобто величина ЧЗМФ не залежить від полярності оточення зондів у межах групи. Таким чином, можна припустити, що величина ЧЗМФ барвників другої групи залежить також від в'язкості оточення. З іншого боку, барвники першої групи мали значні короткохвильові зсуви максимумів флуоресценції (-18 – -97 нм), тобто найменш полярні сайти зв'язування. При цьому значення ЧЗМФ показали обернену кореляцію зі значеннями короткохвильових зсувів максимумів флуоресценції, що свідчить про значний ефект полярності на ЧЗМФ у межах цієї групи. Вірогідно, що група зондів з низьким ЧЗМФ, зв'язується з сухою поверхнею «стеричної блискавки», а решта зондів – з її вологою поверхнею. На користь цього припущення можна навести наступні міркування: а) нижче значення ЧЗМФ корелює з тим фактом, що суха поверхня «стеричної блискавки» характеризується значним числом гідрофобних залишків амінокислот та відсутністю молекул води, що призводить до зникнення диполь-дипольних взаємодій між водою та зондом (а тому і зниженням значень ЧЗМФ) [323,324]; б) оскільки волога поверхня «стеричної блискавки» має вищу полярність через наявність високої кількості полярних залишків, гідратованих молекулами води, то на ЧЗМФ зондів, зв'язаних з нею, більший вплив має в'язкість оточення [323]; в) оскільки суха поверхня «стеричної блискавки» має високу в'язкість через сильні стекінг-взаємодії сусідніх β -листів, то на ЧЗМФ

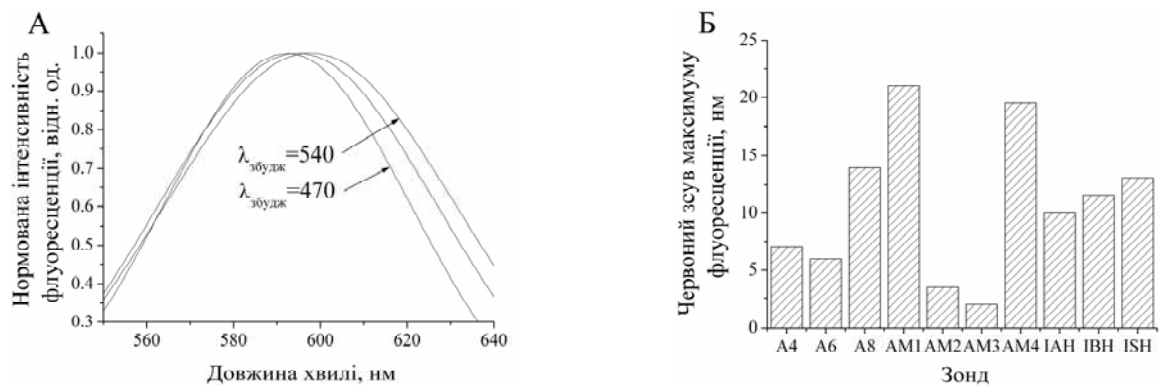


Рисунок 3.33. Спектри флуоресценції AM1 у F_{eth} (А) та значення ЧЗМФ у F_{eth} (Б)

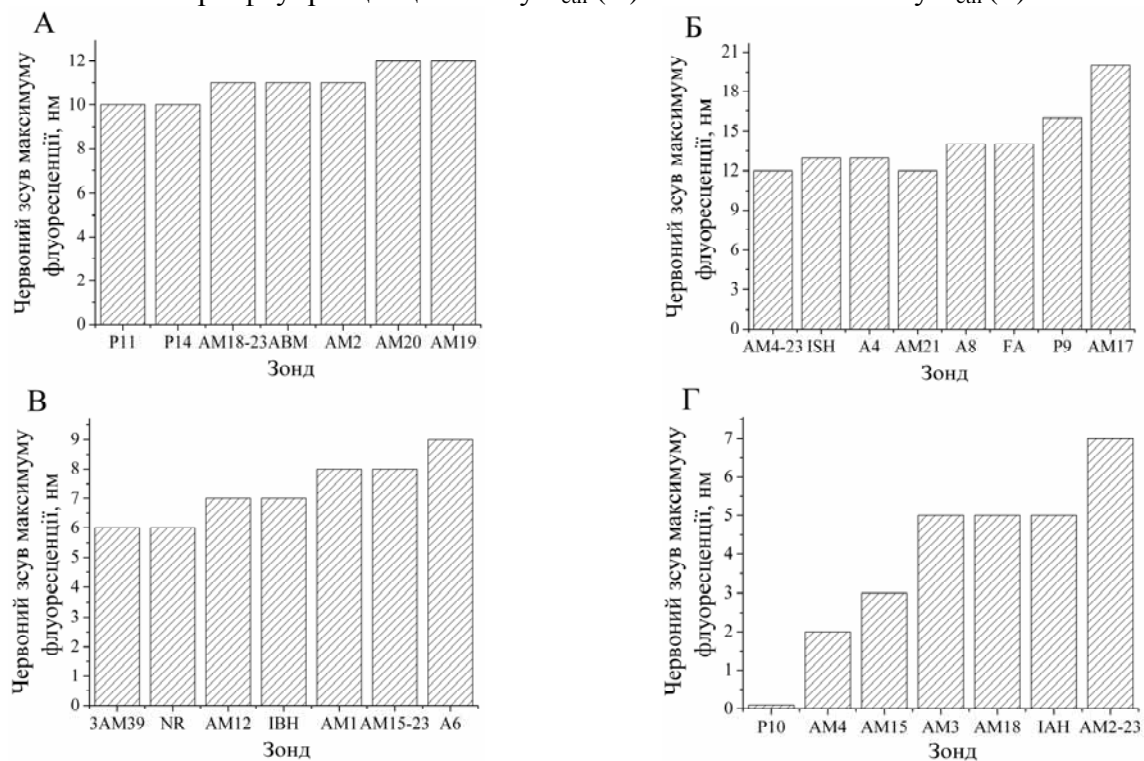


Рисунок 3.34. Значення ЧЗМФ бензантронових зондів у F_{acs}

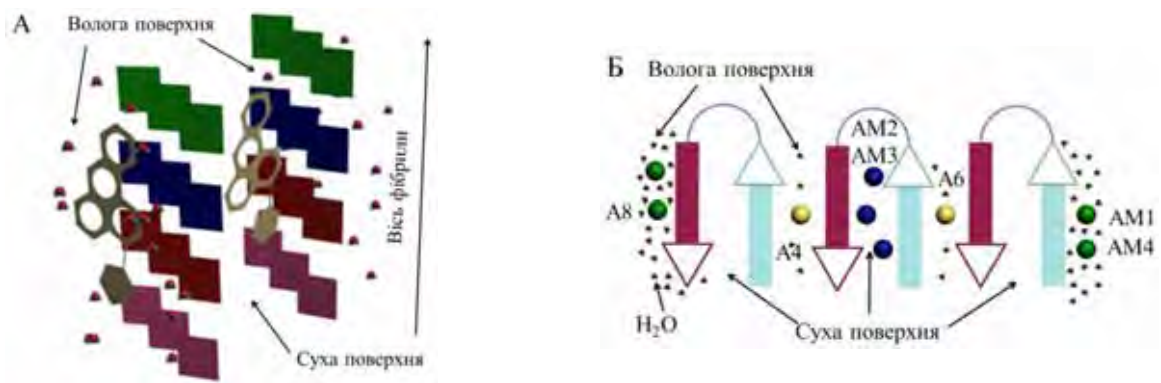


Рисунок 3.35. Вид збоку (2 β -листи) (А) та згори (6 β -ланцюгів) (Б) на схематичне зображення фібрили лізоциму. Зонди AM2, AM3, AM12, AM15 та AM18 можуть зв'язуватися з сухою поверхнею «стеричної блискавки» у присутності F_{eth} , тоді як решта зондів зв'язується з вологою поверхнею «стеричної блискавки» у присутності F_{eth} та F_{ac}

барвників, зв'язаних з нею, сильніший вплив має полярність оточення (різні амінокислотні залишки, що формують жолобки фібрил). На жаль, різницю в'язкості сайтів зв'язування для барвників не було підтверджено вимірами анізотропії флуоресценції через значне розсіювання світла фібрилярними агрегатами. Цікаво також, що роль гідрофобних взаємодій при асоціації зонда з білком досить значна, бо як правило, зонди, що мали низькі значення ЧЗМФ та найбільші короткохвильові зсуви максимумів, були найбільш специфічними до фібрил F_{acs} .

Тепер порівняємо сайти зв'язування барвників з фібрилами F_{eth} та F_{ac} . Цікаво, для зв'язаних з F_{eth} флуорофорів АМ12, АМ15 та АМ18, ЧЗМФ не спостерігалось, для зондів АМ2 та АМ3 цей параметр мав низьке значення, а для решти барвників – високі значення (таблиця 3.1). Певне, що АМ12, АМ15, АМ18, АМ2, АМ3 можуть бути локалізовані на сухій поверхні «стеричної блискавки» F_{eth} , а решта барвників – на вологій, за аналогією з фібрилами F_{acs} , оскільки у даному випадку також можна розділити зонди на дві групи: з низьким та високим ЧЗМФ (рис. 3.35) [114]. При цьому група з низьким ЧЗМФ мала більші короткохвильові зсуви максимумів флуоресценції (-50 – -104 нм) у присутності F_{eth} (тобто менш полярні сайти зв'язування), ніж решта барвників (їх зсуви були -19 – -62 нм, крім АМ4, у якого цей зсув дорівнював -126 нм). Важливим є факт, що низькі значення ЧЗМФ спостерігались для барвників у присутності F_{eth} , що належать переважно до амідіно похідних бензантроні. Можна припустити, що бензантроні зонди (крім п'яти, що зазначені вище) асоціюють із жолобками на поверхні фібрил F_{eth} та F_{ac} (таблиці 3.3 та 3.4), стабілізованих за рахунок водневих та диполь-дипольних зв'язків [323]. Невелику різницю у значеннях ЧЗМФ можна пояснити різними фото-фізичними змінами при збудженні зондів, що відрізняються між собою замісниками у третьому положенні молекули бензантроні. Зокрема, низьке значення електрондонорної сили амінозамісника молекули бензантроні у третьому положенні призводить до низької чутливості

зондів до полярності та в'язкості середовища (у даному випадку – нижчого значення ЧЗМФ) [312,325].

Можливо, також, що асоціація барвників із сухою поверхнею «стеричної блискавки» значно обмежена високою комплементарністю сусідніх β -листів, що беруть участь у стекінгу, залишаючи недостатньо місця для флуорофора [114]. Для зондів AM2, AM3, AM12, AM15 та AM18 мав місце ЧЗМФ у присутності фібрил F_{ac} . Цей факт підтверджує наше припущення про різний ступінь пакування β -листів агрегатів F_{ac} та F_{eth} (наприклад, посилені ван-дер-Ваальсові взаємодії та водневі зв'язки [323] у F_{ac}), що унеможлиблює проникнення флуорофорів у гідрофобну частину β -листа. До того ж, такими відмінностями у характері сайтів зв'язування можна пояснити і значну чутливість AM2 та AM3 до морфології фібрил лізоциму. Для барвників AM3, AM12, AM15, AM18 низькі значення ЧЗМФ (хоча брали інший діапазон хвиль збудження) були у присутності F_{acs} , як і у F_{eth} . Це вказує на роль шейкінгу чи інтенсивності перемішування в утворенні фібрил з менш щільним пакуванням гідрофобних сторін β -листів, що створює передумови для зв'язування даних флуорофорів із сухою поверхнею «стеричної блискавки».

Для того, щоб краще зрозуміти дані ЧЗМФ, на наступному етапі роботи було проведено вимірювання часороздільної флуоресценції барвників у присутності F_{ac} . Часи життя флуоресценції вимірювали за умов насичення зонда білком (при цьому молярне співвідношення концентрацій зонд:білок було 1:4 – 1:25 для різних зондів). Затухання флуоресценції зондів були апроксимовані одно- та двоекспоненційними функціями для DMF та фібрил, відповідно, за аналогією з іншим представником ряду бензантронів – зонда MBA (рис. 3.36) [326]. Більш того, залежності логарифму інтенсивності флуоресценції флуорофорів від часу у DMF виявилися лінійними (рис. 3.36А, вставка), що підтверджує однокспоненційну форму затухання флуоресценції [92]. На рис. 3.37 також наведено часові залежності зважених залишків та функцій автокореляції, що коливаються навколо нуля, і разом із значенням χ^2 (таблиця 3.12) характеризують якісну підгонку профілів затухання зонда А6. Цікаво, що

розраховані часи життя флуоресценції бензантронів у DMF були подібні до MBA (~12 нс) (таблиця 3.12). У випадку F_{ac} зроблено припущення, що довгохвильова компонента часу життя (τ_1) відповідає зв'язаному з фібрилами зонда (через нижчу полярність оточення, ніж у буфері), тоді як короткохвильова компонента характеризує флуоресценцію зонда у буфері (полярне середовище), як було показано для амілоїдних маркерів Нільського Червоного та АНС [327,328]. Дійсно, значення τ_1 у присутності F_{ac} та у DMF були близькими (таблиця 3.12). Із цих даних зроблено висновок про те, що полярність оточення зв'язаного з фібрилами зонда нижче, ніж у буфері і подібна до DMF ($\epsilon_{DMF} \approx 37$). З іншого боку, час життя може зростати разом з в'язкістю оточення, як показано для ThT [138]. Короткохвильова компонента τ_2 , вірогідно, відповідає часу життя зондів у буфері. Той факт, що всі зонди показали ЧЗМФ у присутності F_{ac} , свідчить про їх жорстке оточення, і робить неможливим розділення ефектів в'язкості і полярності на довгохвильову компоненту зонда. Більш того, τ_1 , вклад фракції зонда f_1 , у стаціонарну інтенсивність флуоресценції і середній час життя $\langle \tau \rangle$ були пропорційні до значень ЧЗМФ (крім A4, AM1, AM2 та AM3) (таблиця 3.4). Такі результати можна інтерпретувати наступним чином: хоча усі зонди, скоріше за все, займають один тип сайтів зв'язування – жолобки фібрил, локальний час релаксації розчинника коливається у залежності від бокових залишків амінокислот, що формують сайт зв'язування зонда. Таким чином, зростання τ_1 ($f_1, \langle \tau \rangle$) пропорційно зростанню ЧЗМФ підтверджує наше припущення про зростання в'язкості локального оточення зонда. Цікаво, що така залежність характерна для молекулярних роторів.

В цілому, вимірювання часороздільної флуоресценції зондів у DMF і у F_{ac} показало, що ці барвники асоціюють з одним типом сайту зв'язування на фібрилі, що характеризується нижчою полярністю, ніж полярність буфера. Також слід зауважити, що ЧЗМФ фібрил зростає разом із в'язкістю жолобків

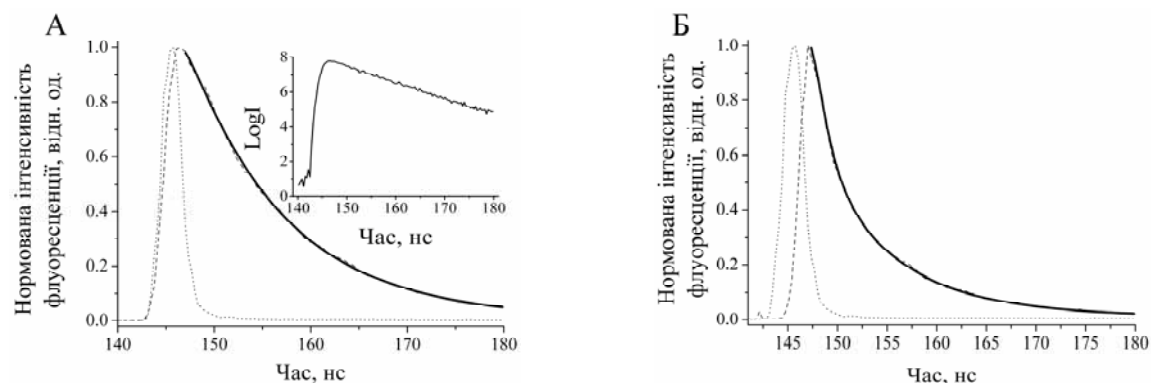


Рисунок 3.36. Спектри часороздільної флуоресценції А6 (або її логарифму LogI) у DMF (А) та у F_{ас} (Б). Профілі затухання були апроксимовані одно- (А) та дводекспоненційними (Б) функціями (суцільна лінія). Концентрація зонда та білка: 0,65 та 30 мкМ, відповідно

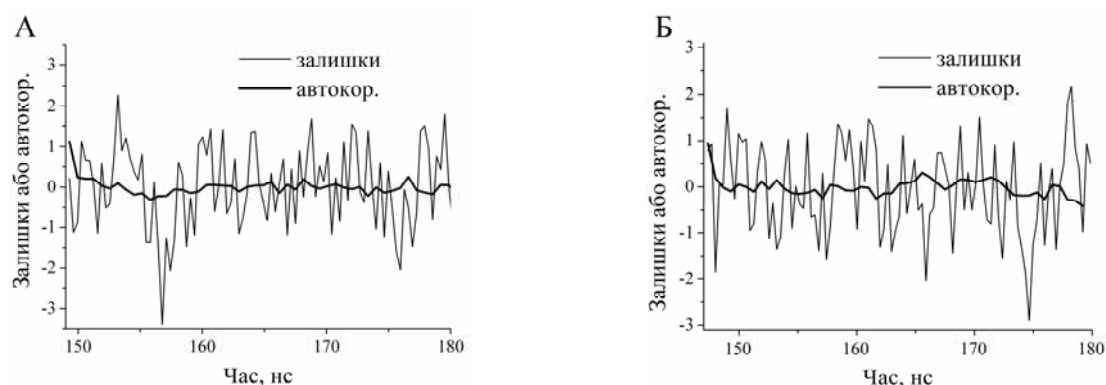


Рисунок 3.37. Зважені залишки та функція автокореляції залишків А6 у DMF (А) та у F_{ас} (Б)

Таблиця 3.12

Часи життя флуоресценції бензантронових зондів у DMF та у присутності фібрил F_{ас}

Зонд	DMF		F _{ас}					
	τ , нс	χ^2	τ_1 , нс	τ_2 , нс	f_1	f_2	$\langle \tau \rangle$, нс	χ^2
A4	8,2±0,4	1,02	6,7±0,42	1,6±0,16	0,41	0,59	3,7	0,97
A6	9,8±0,05	1,04	7,8±0,21	1,3±0,25	0,75	0,25	6,1	1,02
A8	5,8±0,01	1,01	8,3±0,24	1,3±0,11	0,51	0,48	4,9	0,98
AM1	3,9±0,2	1,16	7,5±0,03	1,59±0,002	0,61	0,39	5,21	1,11
AM2	8,2±0,04	1,08	7,1±0,16	0,73±0,06	0,31	0,69	2,7	1,01
AM3	8,6±0,05	1,02	5,6±0,64	0,55±0,08	0,45	0,55	2,8	1,05
AM4	8,5±0,05	0,87	8,1±0,37	2,00±0,2	0,55	0,45	5,3	1,02
AM12	8,7±0,005	0,94	6,83±0,25	1,55±0,24	0,69	0,31	5,2	0,83
AM15	8,3±0,03	0,89	6,72±0,08	0,72±0,09	0,59	0,41	4,24	1,01
AM18	7,5±0,04	1,09	6,84±0,19	2,09±0,14	0,45	0,55	4,23	1,08
IAH	6,8±0,15	0,98	6,02±0,35	1,32±0,3	0,43	0,57	3,33	0,88
IBH	8,3±0,08	0,95	6,24±0,16	0,46±0,17	0,54	0,46	3,6	0,95
ISH	7,5±0,01	1,30	5,9±0,35	1,14±0,11	0,32	0,67	2,7	1,05

зв'язування зонда. Крім того, ці дані свідчать про чутливість часу життя флуорофорів до жорсткості оточення, подібно до ThT [138].

Нарешті, доцільно проаналізувати, які саме типи взаємодій «зонд-білок» впливають на чутливість нових зондів та ThT до фібрил лізоциму. ThT та CR зв'язуються із жолобками фібрил, що мають велику площу гідрофобної поверхні і дозволяють лігандам проникнути усередину фібрили [114,124]. До того ж, ван-дар-Ваальсові контакти виникають між барвниками та поліпептидним ланцюгом жолобків, що формують сайти зв'язування [124,166]. Більш того, стеричні та ароматичні взаємодії можуть грати суттєву роль у визначенні специфічності флуорофорів до агрегатів білка [228,299]. Нарешті, електростатичні взаємодії важливі для класичних амілоїдних маркерів. Наприклад, ThT не зв'язується з позитивно зарядженим полі-L-лізином та має низьку специфічність до пріонного білка HET(218-289) при кислому рН у порівнянні з нейтральним [149]. Продemonстровано, що сольові містки між двома сульфатними групами конго червоного та позитивно заряджених амінокислотних залишків необхідні для зв'язування зонда з полі-L-лізином, пріонним білком HET(218-289), фібрилами A β (1-42), тощо [115,116,329].

Такі дані дозволили пояснити, чому більшість зондів мають вищі константи асоціації та квантові виходи у фібрилах F_{eth} та F_{acs} , ніж ThT (таблиця 3.3, 3.4). Цьому сприяє значна ліпофільність бензантронів через відсутність у їх складі заряджених груп і наявність великої кількості ароматичних груп. Таким чином, нові флуорофори, подібно до нейтрального аналогу ThT, сполуки В Пітсбурга, можуть проникати глибше усередину жолобка, що призводить до зростання ароматичних, стеричних та гідрофобних взаємодій білок-зонд [166]. Крім того, висока ліпофільність барвників надає їм можливість зв'язуватися з сухою поверхнею «стеричної блискавки», як продемонстровано для AM2, AM3, AM12, AM15 та AM18 у присутності F_{eth} (таблиця 3.3). Цікаво, що у присутності фібрил F_{acs} квантовий вихід Тіофлавіну Т був вищий, а константа асоціації подібна до афінності нових барвників. Це може свідчити про більшу кількість жолобків (наприклад, ароматичних), де електростатичні взаємодії

слабко впливають на зв'язування класичного амілоїдного маркера з фібрилами, а іммобілізація зонда вища. Через високу чутливість квантового виходу ThT до в'язкості оточення цей зонд і має високе значення Q у F_{acs} .

3.3. Детектування амілоїдних фібрил та вивчення сайтів зв'язування зондів з агрегатами білка методом індуктивно-резонансного переносу енергії

На наступному етапі роботи було проведено вимірювання ІРПЕ між ThT (донор, Д) та бензантроновими зондами (акцептори, А) у присутності фібрил лізоциму F_{ac} , інсуліну Ins_{acs} та варіантів фрагменту аполіпопротеїну А-І. N-кінцевий фрагмент аполіпопротеїну А-І формує амілоїдні фібрили при амілоїдозах печінки та нирок [330]). Ефективність (E) ІРПЕ оцінювали методом гасіння флуоресценції донора, описаним у розділі 2.6.4 (рис. 3.38). Оскільки зонди, обрані для досліджень ІРПЕ, мали високі константи асоціації з фібрилами лізоциму та інсуліну, а ThT – також з МЗ [199], для розрахунку відстаней між донором і акцептором використовували найпростішу модель (розділ 2.6.4). Цікаво, що орієнтація зондів у жолобках може трохи відрізнятися від паралельної до осі фібрили через те, що жолобок довший та ширший за молекулу зонда [114]. Як видно з таблиць 3.13 та рис. 3.39А, перенос енергії

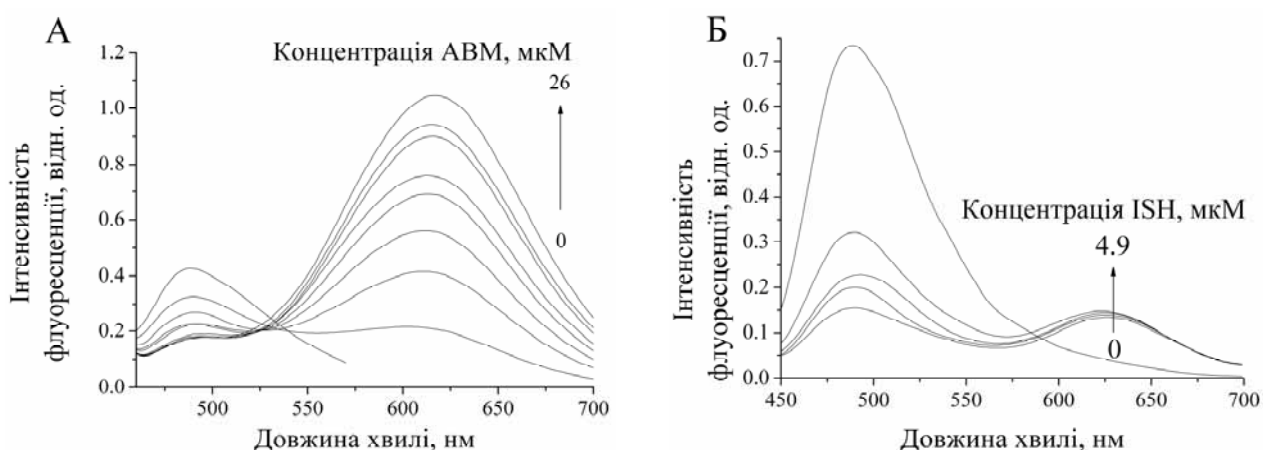


Рисунок 3.38. Спектри флуоресценції тіофлавіну Т у F_{ac} (А) та Ins_{acs} (Б) за зростаючої концентрації зондів АВМ (А) та ІАН (Б). Концентрація ThT та білка: 4,5 і 32 мкМ, відповідно (А) та 3,4 і 9,5 мкМ, відповідно (Б)

між ThT, зв'язаним з фібрилами лізоциму, та бензантроновими зондами, проходить з нижчою ефективністю, ніж у випадку асоціації з агрегатами інсуліну, що свідчить про більші значення Д-А відстаней у присутності лізоциму. Пари ThT-ІАН, ThT-ІВН та ThT-ІSH виявилися більш придатними для вимірювання ІРПЕ, ніж пари ThT-А6, ThT-АВМ та ThT-А8, завдяки більшій різниці між спектрами збудження зондів, а також низькій флуоресценції ІАН, ІВН, ІSH у присутності фібрил, що не заважає вимірювати гасіння флуоресценції ThT (рис. 3.39) [114]. Беручи до уваги цей факт, зонди ІАН, ІВН, ІSH було використано також для визначення ІРПЕ у фібрилах фрагменту аполіпопротеїну А-I, 1-83G26R/W@8 (М3) (таблиця 3.13). Виявилося, що сайти зв'язування бензантронів у фібрилах М3 знаходяться на найменшій відстані від сайтів ThT, тоді як максимальна відстань у парах була при зв'язуванні з фібрилами лізоциму. Також пари зондів ThT-ІАН, ThT-ІВН показали різні значення ефективності ІРПЕ у присутності варіантів фрагмента аполіпопротеїну А-I (рис. 3.39Б).

Опираючись на припущення, що нові флуорофори зв'язуються із жолобками фібрил (тобто специфічний сайт зв'язування кожного зонда один), визначили, що отримані відстані $\sim 2,1\text{--}6,2$ нм відповідають приблизно 3–9 жолобкам (розрахунки наведені нижче). По меншій мірі два фактори підтверджують цю гіпотезу: а) барвники мають високу афінність зв'язування з агрегатами білка [81]; б) довжини β -ланцюгів ядра у фібрилах лізоциму [331], інсуліну [332] та М3 [199] були $\sim 7, 5,6$ та $5\text{--}10$ нм, відповідно, що дозволяє донору та акцептору знаходитись на значних відстанях один від одного і зв'язуватися з жолобками фібрили одного β -листа. Положення зонда у жолобку було визначено за допомогою аналізу геометричних параметрів барвника та сайту зв'язування. По-перше, максимальна відстань (якщо амідна група приймає плоску транс-конформацію) між C_α -атомами у β -ланцюгу дорівнює 3.8 \AA [333]. Тому відстань між C_{an} - та $C_{\alpha(n+2)}$ - атомами, що формують жолобок, не перевищує $7,6 \text{ \AA}$. З урахуванням того, що ядро фібрили утворене β -листами, ця відстань скорочується до $6,5\text{--}6,95 \text{ \AA}$ і менше, якщо брати до уваги об'єм

Таблиця 3.13

Кількісні параметри резонансного переносу енергії між тіофлавіном Т та бензантроновими зондами, зв'язаними з фібрилами лізоциму, інсуліну та варіантом G26R/W@8 фрагмента 1-83 аполіпопротеїну А-I

Фібрили лізоциму F _{ac} (інсуліну Ins _{ac})								
Зонд	[Зонд], мкМ	[ThT], мкМ	[Білок], мкМ	<i>E</i> , %	<i>R</i> ₀ , нМ $\kappa^2=0,67$	<i>R</i> , нМ $\kappa^2=0,67$	<i>R</i> _{min} , нМ	<i>R</i> _{max} , нМ
A6	2,5	3,4	1,1 (9,5)	11 (30)	3,4 (3,5)	4,8 (4)	3,5 (3,1)	6,2 (5,3)
ABM	5,5 (12)	4,5 (3,4)	32 (9,5)	65 (78)	3,3 (3,4)	3 (2,8)	2,3 (2,1)	3,9 (3,6)
A8	2,5	3,4	1,1 (9,5)	26 (62)	3 (3,1)	3,6 (2,9)	2,6 (2,1)	4,5 (3,7)
IAH	2,5 (4,9)	3,4	1,1 (9,5)	42 (58)	3,5 (3,8)	3,7 (3,6)	2,7 (2,7)	4,7 (4,6)
IBH	4,8	3,4	1,1 (9,5)	35 (69)	3,6 (3,7)	4 (3,2)	3 (2,5)	5,1 (4,2)
ISH	12 (9,6)	3,4	1,1 (9,5)	68 (79)	3,8 (3,9)	3,4 (3,1)	2,5 (2,3)	4,3 (4,1)
Фібрили M3 (G26R/W@8)								
IAH	2,3	3,1	0,6	73	3,5	3,0	2,2	3,8
IBH	2,3	3,1	0,6	82	3,8	3,0	2,2	3,8
ISH	4,9	4,7	0,5	84	3,8	2,9	2,2	3,7

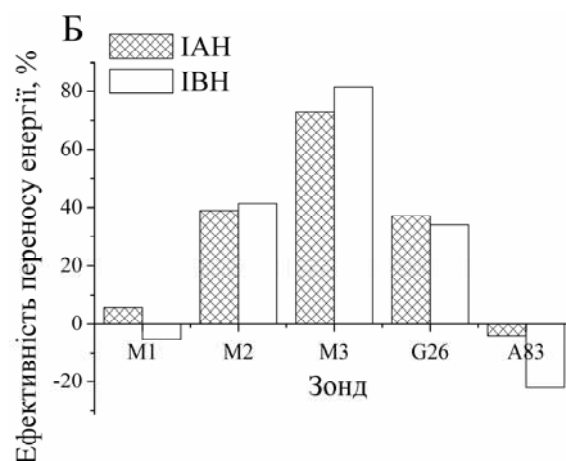
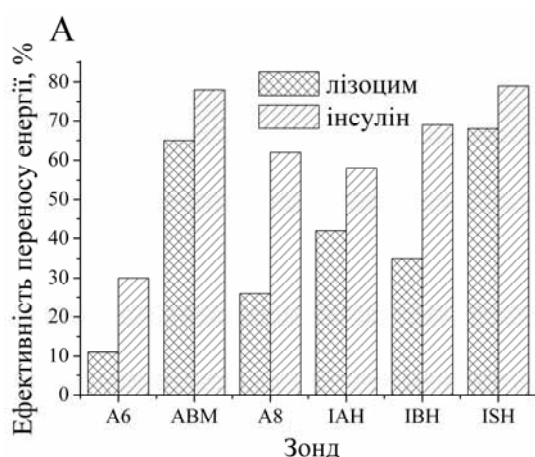


Рисунок 3.39. Ефективність резонансного переносу енергії між ThT та бензантроновими зондами у присутності фібрил лізоциму F_{ac} (інсуліну Ins_{acs}) (А) або варіантів фрагменту апо-А-I (Б)

бокових залишків амінокислот [155]. Відстань між сусідніми β -листами та β -ланцюгами у типовій фібрилі дорівнює ~ 11 та $\sim 4,8$ Å, відповідно [135]. Причому, β -листи, що формують суху і вологу поверхні «стеричної блискавки» для фрагменту пептиду дріжджів Sup35 були віддалені один від одного на 8.5 та 15 Å, відповідно [323]. Довжина зондів складає ~ 1.1 – 1.9 нм, ширина ~ 0.7 – 1.1 нм, товщина ~ 0.2 – 0.7 нм. Це означає, що барвники мають зв'язуватися з жолобком не лише так, щоб їх головна вісь була паралельна осі фібрили, але і так, щоб коротка вісь була їй перпендикулярна (рис. 3.40, ліворуч). До того ж, барвники AM1, AM15, P11, A4, IAH, IBH, 3AM39 не можуть зв'язуватися з сухою поверхнею «стеричної блискавки» через те, що їх ширина перевищує 8,5 Å, якщо припустити, що відстань між гідрофобними поверхнями β -листів схожа у фібрил лізоциму та Sup35. Цікаво, що зонд AM15 у присутності F_{eth} , і зонди AM15, IAH, IBH, 3AM39 у присутності F_{acs} асоціювали з такою поверхнею, можливо, через менш щільне розташування гідрофобних поверхонь β -листів у F_{eth} та F_{asc} , ніж у F_{ac} , що показує інший тип пакування цих поверхонь та менш важливу роль міжмолекулярних гідрофобних взаємодій «білок-білок» у формуванні F_{eth} .

Кількість β -ланцюгів для зв'язування флуорофорів знаходили як відношення довжини зонда до відстані між сусідніми β -ланцюгами плюс 1. Виявилося, що для асоціації нових зондів з білком треба, щоб β -лист складався мінімум з 5–6 β -ланцюгів. Важливо, що 24 нові зонди, крім P10, IAH, IBH, ISH, мають стехіометрію зв'язування з лізоцимом F_{acs} меншу 0,2 (0,02–0,16), тобто 1 зонд зв'язується з 5 і більше молекулами білка, що свідчить про один тип сайтів і про зв'язування у жолобках фібрили (інакше було б більше значення n , як у випадку зв'язування з нативним білком). Також існує певна відстань між двома зондами в одному жолобку (бо $n < 0.2$), що варіюється, але у середньому може складати 15 β -ланцюгів (оцінили на основі аналізу довжини зондів, їх максимально можливих та розрахованих значень n). Цікаво, що ця відстань не залежить від закручення β -листа у протофіламенті, бо період закручення складає від 45 до 200 нм для фібрил лізоциму [98,194,228,282]. Значна відстань

між зондами у ряді (для ThT вона була лише у кілька ланцюгів [114]) може свідчити про щільне пакування β -листів у структурі фібрил і неможливість барвників асоціювати з певними фрагментами β -листів, що знижує ефективну концентрацію білка, зв'язаного із зондом. Для P10, IAH, IBH, ISH стехіометрія зв'язування була 0,33–0,5, тому, можливо, вони мають 2 типи сайтів зв'язування з білком, один з яких не є специфічними. Це узгоджується з нелінійними залежностями B/F від B у присутності F_{acs} (рис. 3.11).

Паралельне однонаправлене упорядкування β -ланцюгів кожного β -листа, що, як правило, спостерігається в амілоїдних фібрилах, і певне, унеможливорює ІРПЕ між D та A з латерально асоційованих β -листів вологої поверхні «стеричної блискавки» [333]. В інакшому випадку, такий перенос мав би характеризуватися у 2–4 рази меншими D – A відстанями [334]. З цих самих причин можна сказати, що не виникає конкурентного зв'язування між ThT та новими зондами [247]. Різні D – A відстані у присутності фібрил одного типу свідчать про гетерогенність специфічних сайтів зв'язування бензантронів з білком (жолобки складаються з різних амінокислот), що можна перевірити за допомогою молекулярного докінгу.

Через відсутність чітко визначених структур фібрил лізоциму, інсуліну та фрагменту 1-83 аполіпопротеїну A-I (за допомогою методів РСА чи ЯМР), а також моделей фібрил (отриманих методом молекулярного моделювання), спробуємо виявити найбільш амілоїдогенні області поліпептидного ланцюга, щоб зробити припущення про конкретні сайти зв'язування бензантронів з агрегатами білка. Для фібрил лізоциму, сформованих у кислому рН, ці області відповідають залишкам 49–101 [59], а також 54–62 (K-пептид), що показано за допомогою протеолізу та електронної мікроскопії [335]. Ці області представлені двома гідрофобними кластерами білка, розділеними гідрофільною частиною залишків 65–75. До того ж, у кислому середовищі, зв'язки аспарагінової кислоти з наступною амінокислотою у ланцюгу можуть руйнуватися шляхом гідролізу і утворювати фрагменти білка. У даному випадку не будемо розглядати короткі фрагменти (бо їх утворюється мало через

високу стабільність лізоциму [238]), а припустимо, що вся молекула згорнулася у β -шпильку (залишки 49–69 та 80–101), з якої потім формується подвійний β -лист; залишки 70–79 формують бета-петлю, а залишки 1–49 та 102–129 належать до неупорядкованої частини бета-ланцюга (рис. 3.40, праворуч). При цьому залишки з непарними номерами утворюють вологу поверхню «стеричної блискавки», а з парними – суху (через більшу кількість полярних та заряджених амінокислот з непарними номерами). Можливість формування бета-петлі впливає із паралельного розташування двохшарового крос-бета мотиву лізоциму, коли ліві частини шару паралельні між собою, але антипаралельні до правих (рис. 3.40, праворуч). Ядро фібрили інсуліну за умов кислого рН формують залишки В-ланцюгу молекули: В3–В7, В10–В19 (у тому числі 2 залишки цистеїну), що було показано за допомогою методів раманівської спектроскопії та ЯМР у комбінації з водно-дейтерієвим обміном [336]. Аспарагін 7 та 19, напевне, знаходяться на вологій поверхні «стеричної блискавки», бо утворюють дисульфідні містки з ланцюгом А білка. У цьому випадку у гідрофобному ядрі агрегатів інсуліну знаходяться залишки В4–В18. З іншого боку, залишки В4–В18 можуть утворювати гідрофільну частину фібрили, оскільки полярність фібрил лізоциму нижча, ніж фібрил інсуліну. Для фрагменту аполіпропротеїну А-I ядро фібрил формують залишки 15–20 та 50–57 (двохшаровий крос-бета мотив). Припустимо, що суху поверхню «стеричної блискавки» утворюють залишки з парним номером, бо амілоїдогенні мутації у положенні 8, 26, 50 та 72 призвели до росту фібрил 3 неупорядкованого фрагменту [191,199]. Схематичне зображення β -ланцюга фібрил лізоциму, інсуліну та М3 представлено на рис. 3.40, праворуч.

Тепер будемо розглядати сайти зв'язування зондів з вологою поверхнею «стеричної блискавки». Оскільки ThT зв'язується із сайтами, що містять залишки ароматичних амінокислот [226], вочевидь, він знаходиться у жолобках, що мають у складі ароматичну амінокислоту (тирозин): T51_Y53_I55 (лізоцим), A14_Y16_V18 (ланцюг В інсуліну), T16_Y18 (М3). Жолобки R61_W63_N65 можуть теж бути сайтами зв'язування зонда, проте вони, поряд з

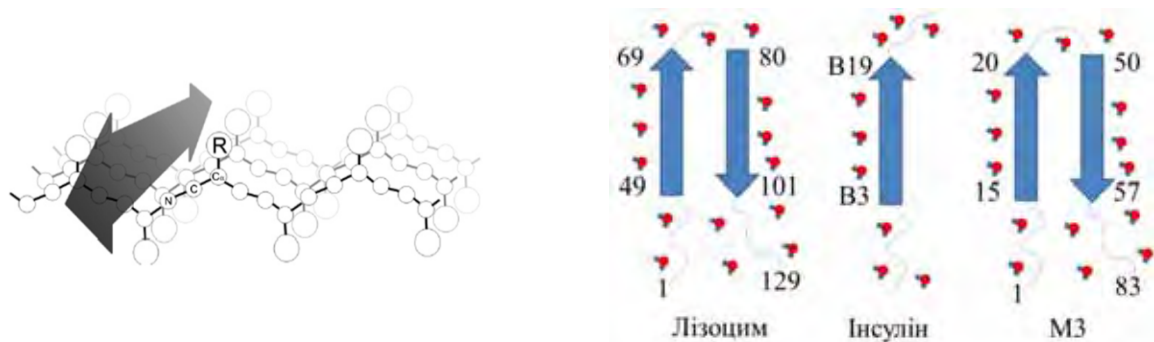


Рисунок 3.40. Геометрія розташування бензантронових зондів у β -листі. Довга вісь барвника паралельна, а коротка вісь – перпендикулярна осі фібрили. Взято з [155] (ліворуч). Зображення β -ланцюгів фібрил, де стрілками показано ядро фібрил, кривими лініями – неупорядковану структуру, а цифри означають номери амінокислотних залишків (праворуч). Фібрили лізоциму та М3 можуть утворювати подвійні β -листи, що складаються з паралельних та у регістрі β -ланцюгів. Молекули води стабілізують вологу поверхню «стеричної блискавки»

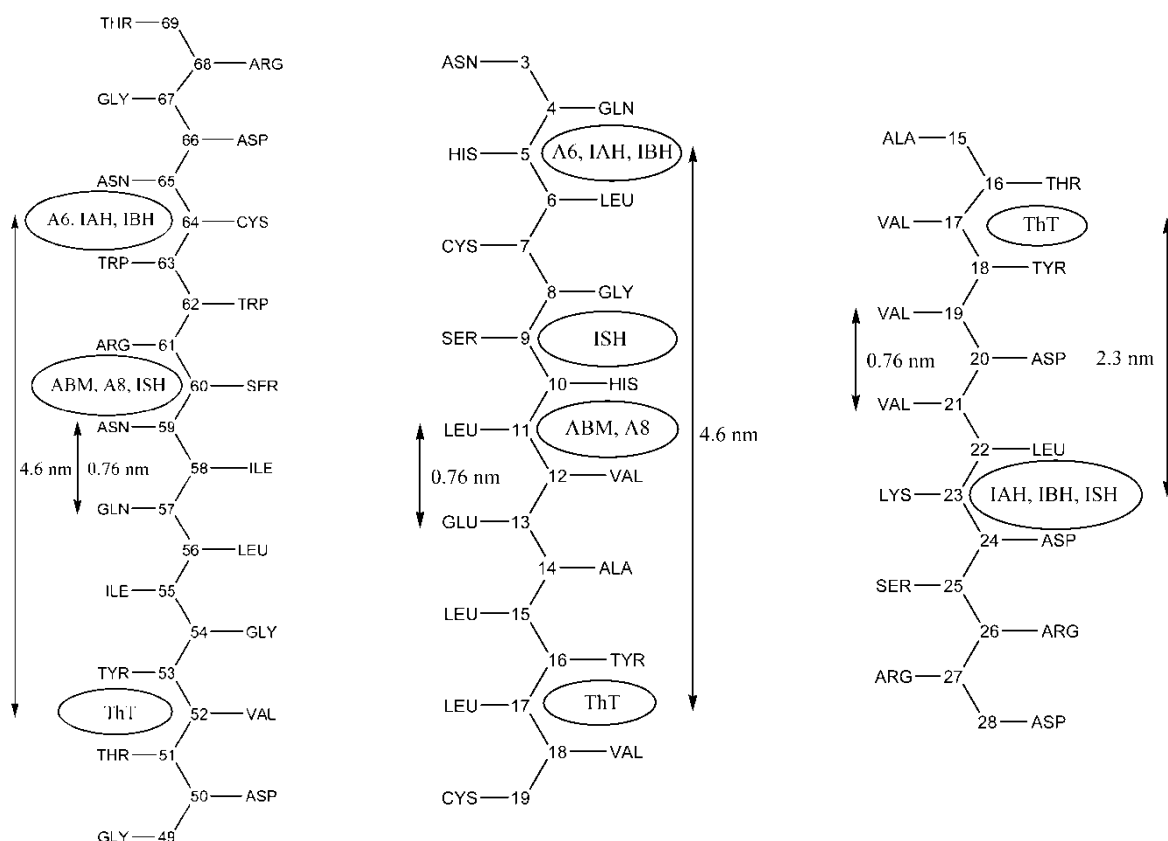


Рисунок 3.41. Схематичне зображення розташування зондів у жолобках фібрил лізоциму (ліворуч), інсуліну (посередині) та М3 (праворуч), сформованих паралельними у регістрі β -ланцюгами (показано 1 ланцюг кожного β -листа). Зображення отримане на основі даних резонансного переносу енергії (вид перпендикулярно осі). Відстань між кожним другим амінокислотним залишком у β -ланцюгу 0,76 нм

ароматичним триптофаном, мають аргінін, що знижує спорідненість ThT до цих жолобків. Цікаво, що на β -листі інсуліну є лише ароматичні залишки для зв'язування ThT, тоді як у фібрилах лізоциму це можуть бути і негативно заряджений D52 та ароматичний W62. Однак, D52 та W62 можуть знаходитися на сухій поверхні «стеричної блискавки», що має мало сайтів зв'язування для ThT через стеричні обмеження [166]. Аналізуючи відстані між донором та акцептором (таблиця 3.13), виявили жолобки, сформовані такими боковими залишками амінокислот ядра фібрили, що можуть слугувати сайтами зв'язування для бензантронів: R61_W63_N65_G67_T69 (лізоцим), Q4_L6_G8_H10_V12 (ланцюг В інсуліну) та L22_D24_R26_D28 (M3). З цих сайтів лізоциму для зондів A6, IAH, IBH обрали найбільш вірогідний, що має ароматичний залишок триптофану і нейтральну молекулу аспарагіну W63_N65; для зондів ABM, A8 та ISH – сусідній сайт R61_W63, що має позитивно заряджений аргінін. Дійсно, як видно з короткохвильових зсувів максимумів і даних ЧЗМФ, зонди ABM, A8, ISH мали більш полярне оточення, ніж зонди A6, IAH, IBH у присутності фібрил F_{acs} . Висока чутливість ABM до F_{acs} пояснюється його чутливістю до в'язкості фібрил, тоді як для IAH, IBH – низькою полярністю оточення. Дійсно, якщо виразити гідрофобність залишків триптофану та аргініну через енергію переносу цих залишків з октанолу у воду, отримаємо значення 9,4 та – 4,2 кДж/моль, відповідно (тобто триптофан найбільш гідрофобний, аргінін – найменш гідрофобний) [337]. Для інсуліну група ABM, A8 та ISH з найбільшою вірогідністю зв'язується з сайтами G8_H10, хоча для зондів ABM та A8 є ще один сайт – H10_V12 (зв'язування з гліцином менш вигідне через те, що у цьому сайті підвищена гнучкість фібрили) [338]. Група A6, IAH, IBH зв'язується із сайтом Q4_L6. Можна припустити, що залишки гістидину та валіну призводять до підвищення квантового виходу ABM у присутності інсуліну, у порівнянні із залишками аргініну та триптофану для лізоциму (з 0,35 до 0,5). Квантовий вихід ThT незначно підвищився за наявності залишку валіну (інсулін) замість треоніну (лізоцим). Цікаво, що запропоновані сайти зв'язування ABM з агрегатами обох

білків мають позитивно заряджені амінокислоти, і тому полярність сайтів зв'язування барвника у фібрилах Ins_{acs} та F_{acs} приблизно однакова, судячи із положень максимумів флуоресценції. У випадку варіанту M3 зонди IAH, IBH, ISH, зв'язується, напевне, з сайтом L22_D24 (два інших жолобка характеризуються сильними електростатичними взаємодіями). Цей сайт відрізняється від попередніх наявністю негативно зарядженої аспарагінової кислоти, а також тим, що знаходиться на краю β -листа (в області, де розпочинається β -петля) на боці гідрофобної поверхні фібрили (близько до ядра фібрили). У цьому випадку упаковка протофіламентів у фібрилі може бути менш щільна (пептид згортається у β -структуру з неупорядкованого стану, а інсулін та лізоцим – з частково денатурованого), і тому зонди можуть зв'язатися з сухою поверхнею «стеричної блискавки» фібрил. Схематичне зображення розташування барвників у фібрилах лізоциму, інсуліну та M3 представлено на рис. 3.41. Таким чином, проведений аналіз створив передумови до подальшої конкретизації сайтів зв'язування бензантронів та ThT методами молекулярного докінгу.

Варто відзначити, що ІРПЕ між ThT та новими барвниками виникає лише за наявності амілоїдних фібрил, тоді як у мономерному білку не виникає ІРПЕ між зондами, що продемонстровано, наприклад, для лізоциму [81]. Завдяки цьому даний метод можна використовувати для кількісного аналізу формування фібрил *in vitro* [246,247]. Для того, щоб це показати, було проведено титрування ThT зондами IAH та IBH у присутності різних варіантів фрагменту 1-83 аполіпопротеїну A-I: 1-83G26R/W@50 (M1), 1-83G26R/W@72 (M2), 1-83G26R (G26) та нативного фрагменту 1-83 (A83). Отримані значення ефективності переносу енергії (рис. 3.39Б) корелювали з інтенсивністю флуоресценції і довгохвильовими зсувами максимуму ThT при однаковій концентрації фрагментів білка, тобто зі ступенем його фібрилізації (розділ 2.6). Серед усіх мутантів аполіпопротеїну A-I, M1 та A83 не сформували агрегатів, а G26 та M3 мали різну морфологію, що також підтверджується даними електронної мікроскопії (розділ 2.3). Відповідно, не спостерігали ІРПЕ у

присутності M1 або A83, тоді як ефективність ІРПЕ була у 2 рази нижча у M2, G26 у порівнянні з M3.

У подальших експериментах були проведені вимірювання ІРПЕ між бензантронним зондом АВМ та сквараїнами G6, G7 у присутності F_{acs} , а також між похідними ThT, ICT2, ICT3, та АВМ у присутності F_{acs} та Ins_{acs} (рис. 3.42). Незважаючи на високу ефективність ІРПЕ (78%), значення середніх відстаней між АВМ та G6 були 3,8–5,8 нм. Подібна картина спостерігалась і для G7 (таблиця 3.14).

Можливо, це пов'язано з тим, що сквараїнові зонди нестабільні у буфері (електрон-донорні групи чутливі до нуклеофільних атак), і тому пік флуоресценції акцептора починає падати при зростанні його концентрації [218,311]. Якщо брати до уваги, що АВМ локалізується у жолобку N59_R61,

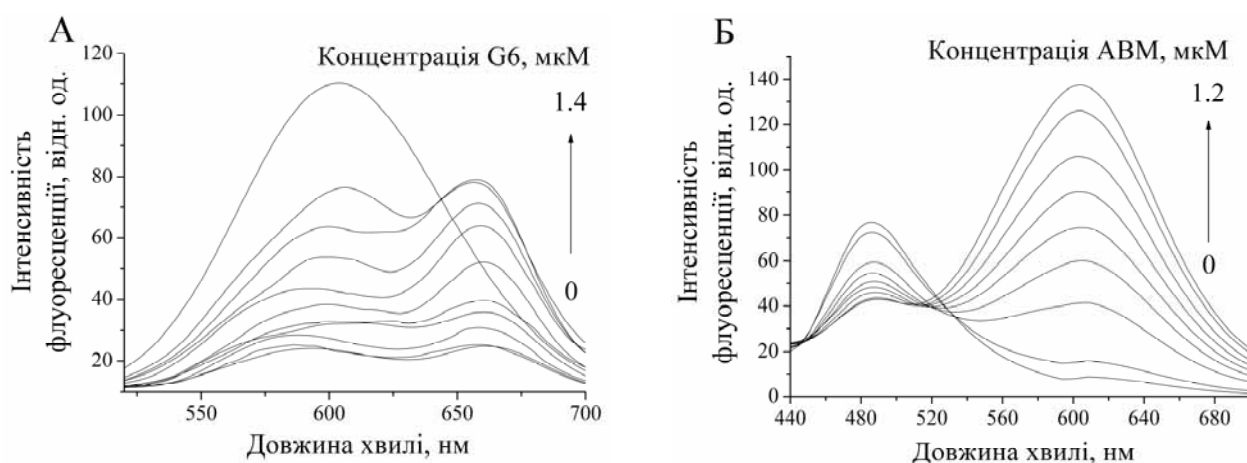


Рис.3.42. Флуоресцентні спектри АВМ у присутності фібрил лізоциму F_{ac} та зростаючої концентрації G6 (А) та спектри ICT2 у присутності фібрил інсуліну Ins_{acs} і зростаючої концентрації АВМ (Б). Концентрації АВМ та білка були 4,8 і 10 мкМ, відповідно (А), концентрації ICT2 та білка були 7 і 0,1 мкМ, відповідно (Б)

то сквараїни можуть розташовуватись на краю β -ядра фібрили: у жолобках T47_G49, поруч з ThT, або ближче до β -петлі фібрили: R73_L75 (не у β -ядрі). Однак, оскільки G6 та G7 мають високу чутливість до фібрил лізоциму, як і АВМ, то результати ІРПЕ (що свідчать про зв'язування зондів з менш специфічними сайтами фібрил) потребують подальшої верифікації.

Вірогідним сайтом зв'язування для похідних ThT з фібрилами F_{acs} є сайт

Таблиця 3.14

Кількісні параметри індуктивно-резонансного переносу енергії між АВМ та сквараїновими зондами G6, G7, зв'язаними з фібрилами лізоциму F_{acs} , а також між похідними ThT та АВМ у присутності F_{acs} (Ins_{acs})

Зонд	[Донор], мкМ	[Акцептор], мкМ	[Білок], мкМ	E , %	R_0 , нм $\kappa^2=0,67$	R , нм $\kappa^2=0,67$	R_{min} , нм	R_{max} , нм
G6	1,4	1,4	3	78	6,3	5,1	4,1	6,4
G7	3,5	1,4	3	74	6,7	5,6	4,4	6,8
ICT2	1 (0,1)	1,2	12 (7)	22 (40)	13,5 (13,5)	16,7 (16,3)	16,7 (12)	21 (18)
ICT3	0,4 (0,1)	0,7	12 (7)	30 (56)	19,2 (19,2)	23,7 (18,4)	19,3 (15)	30 (23)

ThT – жолобок T51_Y53, бо вони знаходяться на відстані у 3 жолобка від АВМ (таблиця 3.14, рис. 3.42Б). Так само сайт асоціації ThT з Ins_{acs} , жолобок Y16_V18, може бути сайтом зв'язування похідних ThT з фібрилами, бо відстань від них до АВМ складає 2–4 жолобка. Таким чином, ThT та його похідні локалізуються в однакових жолобках фібрил.

3.4. Висновки

1. Нові флуоресцентні зонди мають високу чутливість до фібрил лізоциму та інсуліну, і незначну – до нативного білка, що створює передумови для їх використання у якості амілоїдних маркерів *in vitro*. Найвищу специфічність до F_{acs} показали: G6, G7, ІАН, АВМ, АМ4, ІВН, АМ12, А4, ЗАМ39, АМ15, АМ2-23 та АМ18-23.

2. Аналіз значень квантового виходу, констант асоціації, зсувів максимумів флуоресценції, середнього часу життя флуорофорів та ЧЗМФ вільних та зв'язаних зондів виявив, що чутливість зондів до амілоїдних фібрил, головним чином, зумовлена зростанням стеричних ефектів (для ThT та його похідних, сквараїнів) та зниженням полярності (для бензантронів) локального оточення. При цьому саме чутливість до полярності оточення пояснює вищу

специфічність більшості бензантронів до фібрил F_{ac} , F_{eth} , ніж ThT. Специфічність G6 до фібрил лізоциму була вищою, ніж у ThT.

3. За допомогою аналізу положень максимумів флуоресценції АВМ та G6 показано, що полярність амілоїдних фібрил спадає у наступному ряду: $Ins_{ac} \rightarrow Ins_{acs} \rightarrow F_{ac} \rightarrow F_{eth} \rightarrow F_{acs}$. Також продемонстровано, що зонди G6, G7 та AM2, AM3 мають найвищу чутливість квантових виходів флуоресценції до морфології амілоїдних фібрил різної полярності.

4. Нові зонди можна використовувати для визначення жорсткості амілоїдних фібрил, оскільки більша жорсткість корелювала, як правило, зі зниженням стехіометрії зв'язування барвників.

6. Аналіз часу життя барвників, констант асоціації та графіків Скетчарда показав наявність лише одного типу сайтів зв'язування для більшості зондів – жолобків вздовж головної осі амілоїдної фібрили, хоча 9 барвників мали ще й неспецифічні сайти.

7. За допомогою методу ІРПЕ зроблено припущення про локалізацію бензантронів зондів у конкретних жолобках фібрил інсуліну, лізоциму та фрагменту 1-83 аполіпопротеїну А-I G26R/W50F_W72F, що створює підґрунтя для подальшого аналізу методом молекулярного докінгу. Вірогідність локалізації зондів у цих сайтах досить висока, оскільки вони мають ароматичні залишки амінокислот, а для тіофлавіну Т та його похідних сайти зв'язування виявилися однаковими.

РОЗДІЛ 4

ДЕТЕКТУВАННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ ЗА ДОПОМОГОЮ НОВИХ ЗОНДІВ ПРИ ВАРІЮВАННІ УМОВ ЗОВНІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

4.1. Спектральні властивості нових флуорофорів у розчинниках з різною полярністю та в'язкістю

4.1.1. Бензантронові та сквараїнові зонди

На наступному етапі роботи уявлялось доцільним оцінити чутливість бензантронових та сквараїнових зондів до полярності та в'язкості середовища – основних факторів, що модулюють їх флуоресцентні відповіді у присутності амілоїдних фібрил (розділ 3.1). Для цього спектри флуоресценції барвників (5 мкМ) у GL порівнювали зі спектрами у DCM та DMF, рис. 4.1 (розділ 2). Цікавим є факт, що більша частина амідіно похідних бензантрону – AM1, AM2, AM3, AM4, AM12, AM15 та AM2-23, мали максимуми в області 511 – 540 нм у GL, а основні максимуми близько 600 нм зникали (рис. 4.2A). Це не може бути викликане переходом зі стану TICT у LE стан, оскільки ці спектральні зміни не супроводжувались зростанням квантового виходу і не спостерігались у присутності амілоїдних фібрил (що теж є в'язким середовищем) [339]. Логічно також припустити, що водневі зв'язки не відіграють домінуючу роль, оскільки для сполук з карбонільною групою та $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами абсорбції, спостерігається позитивний сольватохромізм [305]. Можливо, гіпсохромні зсуви зумовлені зміною геометрії амідінобензантронів при утворенні водневих зв'язків із GL, що показано для системи «вода/формальдегід» з $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами абсорбції [305]. Дійсно, саме амідінопохідні бензантронів мали блакитні зсуви максимумів (~50–100 нм) флуоресценції в етанолі у порівнянні з амінобензантронами через слабшу взаємодію замісників з π -електронною системою та ароматичною частиною бензантронів [8]. У зондів A6, A4, IAH, AM18, P14, P10, AM18-23 у GL спектри флуоресценції зсунуті у довгохвильову

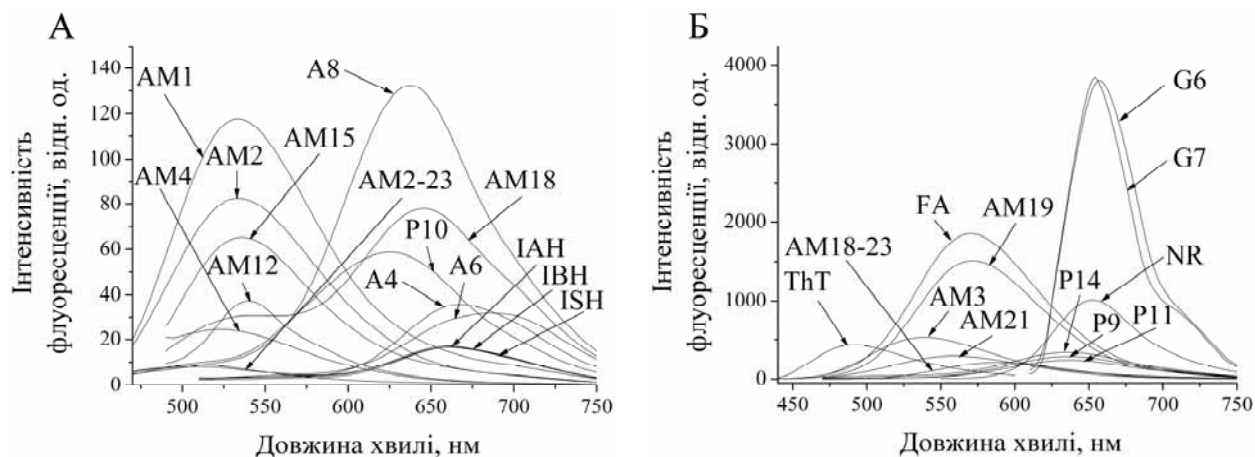


Рисунок 4.1. Спектри флуоресценції нових зондів у гліцерині. Концентрація AM18-23 становила 2,5 мкМ, решти барвників – 5 мкМ

область відносно буфера, а у решти зондів – максимуми такі ж, як і в буфері (рис. 4.2Б). Це може бути зумовлено інтенсивними водневими зв'язками між розчинником-донором протонів та карбонільними групами барвників (що посилює акцепторну силу цих груп і переважає над загальними ефектами

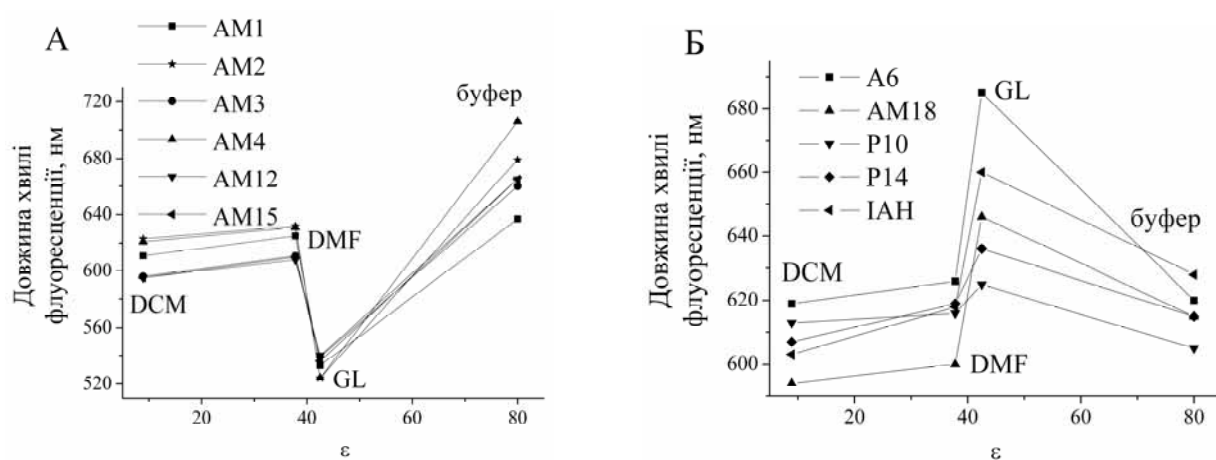


Рисунок 4.2. Залежності максимумів флуоресценції бензантронів від діелектричної проникності середовища

розчинника), як показано Б.М. Красовицьким, І. Грабчевим (для азометинових похідних бензантронів) за допомогою абсорбційної спектроскопії, а також іншими авторами за допомогою флуоресцентної спектроскопії [92,340,341]. Посилення акцепторних властивостей донора призводить до нерадіаційного затухання флуоресценції барвників через зниження кон'югації між

амінозамісником та ароматичним ядром бензантрона [87,92]. В цілому, максимуми флуоресценції бензантронів зростають разом із значенням діелектричної проникності ϵ (рис. 4.3). На рис. 4.3–4.5 λ_{DCM} , λ_{DMF} , λ_{GL} – довжини хвиль максимумів флуоресценції, а Q_{DCM} , Q_{DMF} , Q_{GL} – значення квантових виходів у DCM, DMF та гліцерині, відповідно.

Параметр Q_{DCM}/Q_{DMF} перевищував 1 (крім АМ1), і становив 2,6, 3,3 та 6,5 для А8, Р14, Р10, відповідно. Це свідчить про високу чутливість зондів до полярності оточення. Параметр Q_{GL}/Q_{DMF} , навпаки, був менше за одиницю (за винятком Р10 та Р14), оскільки полярність гліцерину вища (а зростання в'язкості грає незначну роль). Цікаво, що значення Q_{DCM}/Q_{DMF} було приблизно однаковим для усіх бензантронів $\sim 1,2 - 1,5$, але якщо порівняти Q_{DCM} та квантовий вихід зондів у буфері (таблиця 3.1), то отримаємо більшу різницю: зокрема, чутливі до F_{acs} барвники (наприклад, АМ4, ІАН, ІВН, А4, АМ2, АМ3, АМ12, АМ15, ІШН, АМ18, АМ2-23, АМ18-23) мають вищу чутливість до зниження полярності ($Q_{DCM}/Q_0 \sim 4 - 24$), ніж група з найнижчою чутливістю до фібрил лізоциму – А6, АМ1, АМ21, Р9, А8, Р10, Р11, Р14, АМ19, FА ($Q_{DCM}/Q_0 \sim 0,4 - 3$).

Група бензантронів, що мали найменш полярні сайти зв'язування з F_{acs} та найнижчі значення ЧЗМФ (розділ 3.2) та зонд АМ2 (специфічний до неполярних сайтів зв'язування F_{eth} , розділ 3.1.2), показали найнижчі значення (за винятком АМ3, Р10) параметра Q_{GL}/Q_{DCM} (на 2 порядки нижчі значень Q_{DCM}/Q_{DMF}).

Це означає, що чутливість зондів до полярності оточення переважає над їх чутливістю до в'язкості. Значення Q_{GL}/Q_{DCM} для А4, А6, ІШН теж були дуже низькі, хоча зонди не входили до вищезазначеної групи. Параметр Q_{GL}/Q_{DCM} для АМ1 і Р10 був 1,63 та 1,08, відповідно, а для решти барвників змінювався у межах 0,14–0,47. Це означає сильніший вплив в'язкості оточення на групу барвників з більшими значеннями ЧЗМФ та максимумів флуоресценції у F_{acs} .

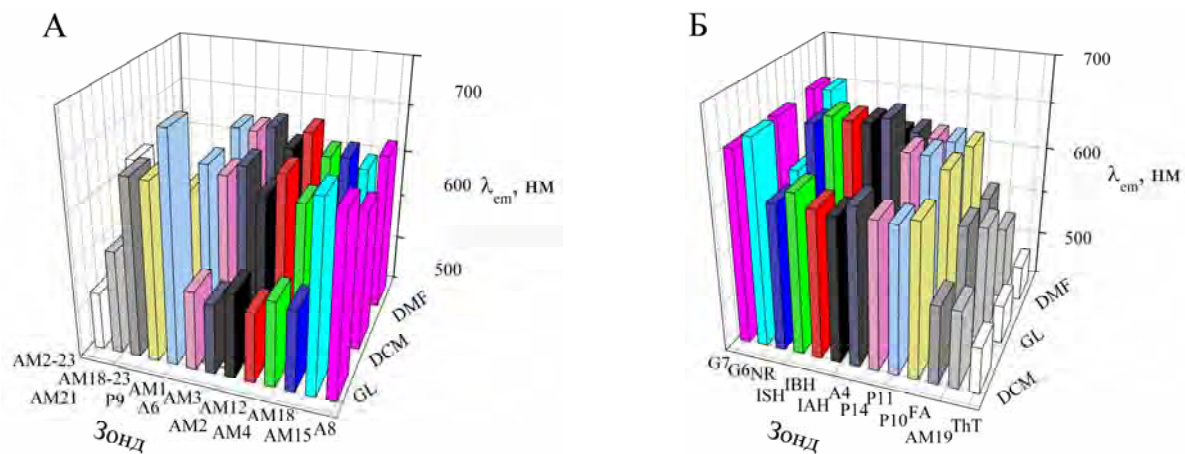


Рисунок 4.3. Залежності максимумів флуоресценції бензантронів та сквараїнів від типу розчинника. Концентрація AM18-23 – 2,5 мкМ, решти зондів – 5 мкМ

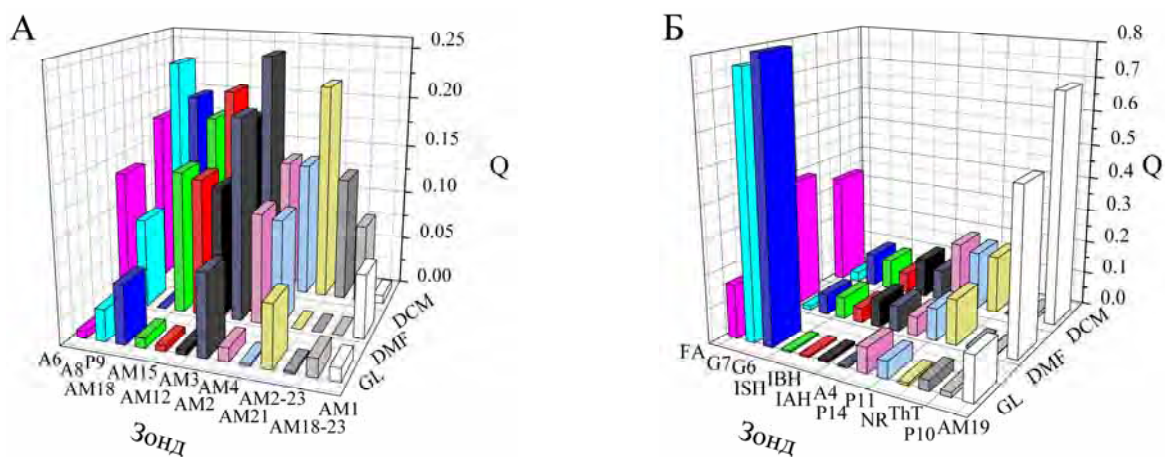


Рисунок 4.4. Залежності квантового виходу флуоресценції бензантронів та сквараїнів від типу розчинника

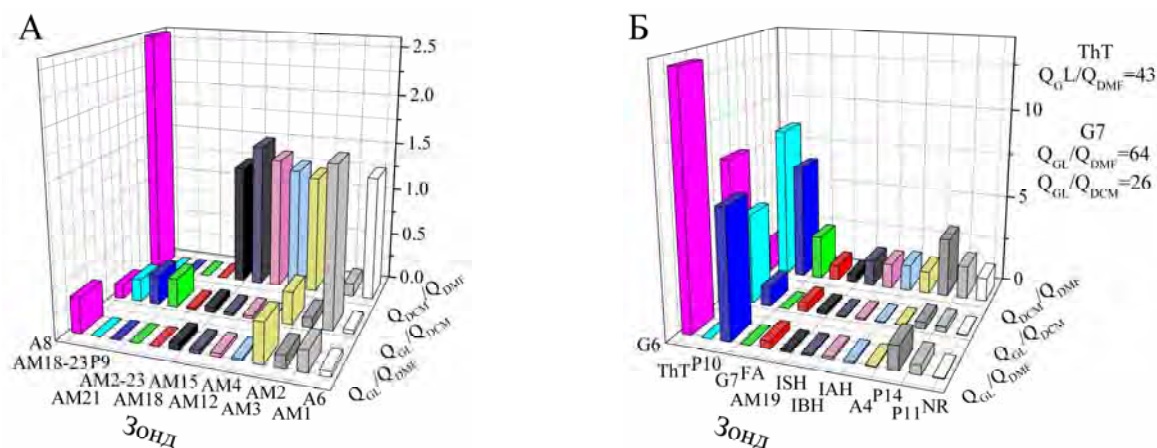


Рисунок 4.5. Відношення квантових виходів флуоресценції бензантронів та сквараїнів у розчинниках різного типу

AM1 і P10 показали найбільшу чутливість квантового виходу до жорсткості оточення, ніж решта бензантронів, але вони знаходяться усередині і в кінці ряду специфічності до амілоїдних фібрил, відповідно (можливо, через вищу полярність оточення AM1 або специфічні зв'язки з фібрилами лізоциму, що знижують квантовий вихід P10). З іншого боку, ThT є найбільш специфічним до F_{acs} та має найвище значення Q_{GL}/Q_{DCM} . Також значення Q_{GL} для ThT подібне до значень, отриманих А.І. Сулатською, і на порядок нижче, ніж у присутності амілоїдних фібрил лізоциму [137], тобто квантовий вихід ThT залежить не лише від внутрішньомолекулярного обертання при збудженні, але і від молекулярної конфігурації основного стану. Оскільки GL та DCM мають різну полярність, то оцінка Q_{GL}/Q_{DCM} занижує роль в'язкості у визначенні спектральних характеристик зондів. Для половини барвників (A6, AM1, AM2, AM4, AM12, AM2-23, P9, AM18-23, A8, P11, IAH, IBH) квантовий вихід у DCM нижчий, ніж у F_{acs} , а при однаковій полярності цих середовищ (є фібрил лізоциму становить приблизно 10 [87]), за підвищення параметра Q відповідає жорсткість агрегатів білка (ці зонди, крім A6, A8, AM2, мали найвищу специфічність до F_{acs}). Решта бензантронів мають трохи нижчий Q в F_{acs} , ніж у DCM, що може означати вищу полярність амілоїдних фібрил. Дійсно, ISH знаходився у зарядженому жолобку, а A6, IAH, IBH – у нейтральному, як показано за допомогою ІРПЕ (розділ 3.3). Таким чином, майже усі бензантрони мають таку ж низьку чутливість до GL, як і NR – зонд-репортер полярності оточення, і не є молекулярними роторами [342]. Чутливість до агрегатів білка визначається їх полярністю (розділ 3.1.1) [9]. Сквараїнові зонди виявилися більш чутливими до в'язкості оточення, ніж до полярності. Зокрема, Q_{GL}/Q_{DMF} та Q_{DCM}/Q_{DMF} були 13,5, 64,3 та 1,7, 2,5 для G6, G7, відповідно. Параметр Q_{GL}/Q_{DCM} перевищував значення для ThT і становив 8 та 26 для G6, G7, відповідно. Цим пояснюється вища чутливість G6 до F_{acs} , ніж бензантронів та ThT; і G6, G7 до Ins_{acs} , ніж бензантронів (розділ 3.1.4). Зокрема, обертання центрального кільця сквараїнів відносно донорів, що призводить до втрати

планарності молекули та гасіння флуоресценції, значно обмежується при зв'язуванні з фібрилами. Слабку чутливість сквараїнів до нативного лізоциму також можна пояснити їх високою чутливістю до в'язкості оточення. Це узгоджується з літературними даними для поліметинових зондів [343,344]. На відміну від результатів даної роботи, у літературі, як правило, йдеться про більший вплив полярності на спектральні характеристики сквараїнів [345,346,347].

4.1.2. Похідні тіофлавіну T

У випадку похідних ThT справедливо припустити, що їх чутливість до полярності та в'язкості середовища подібна до чутливості ThT. Значення I_{GL}/I_{DMF} (концентрації зондів становили 5 мкМ) були найвищі для ThT та ICT3 (99 та 57, відповідно), тобто найбільш яскраву флуоресценцію спостерігали для цих зондів у GL, ніж у DMF (таблиця 3.9). Крім того, сильна кореляція ($k=0,91$) спостерігалася між значеннями I_{Insact}/I_0 (I_{Facs}/I_0) та I_{GL}/I_{DMF} , і порівняно слабка ($k=0,76$) – між I_{Insact}/I_0 (I_{Facs}/I_0) та I_{DCM}/I_{DMF} . Такі результати (а також значення I_{GL}/I_{DCM} , що вищі за 1) свідчать про більшу чутливість зондів до в'язкості, ніж до полярності. Спостерігали також кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил та до полярності (в'язкості) розчинника: ICT2, ICT3, ThT мали добру чутливість до обох чинників, а ICT4, ICT5 – найнижчу чутливість. Слабшу специфічність похідних ThT до амілоїдних фібрил можна пояснити їх нижчими спектральними відповідями у присутності гліцерину (I_{GL}/I_{DMF}). Таким чином, показано, що нові зонди мають ознаки молекулярних роторів, ThT та DCVJ [138,339].

Крім того, чутливість до в'язкості барвників ICT3 та ICT2 (I_{GL}/I_{DMF}) виявилася у 1,7 та 8,3 разів нижчою, ніж у ThT, а флуоресцентна відповідь у присутності амілоїдних фібрил – I_{Insact}/I_0 (I_{Facs}/I_0), була у 6,4 (4,7) та 16,5 (8,7) разів нижчою, відповідно. Це свідчить про вплив параметрів зв'язування з агрегатами білка на флуоресцентну відповідь зондів. Дійсно, константи

асоціації ICT2 та ICT3 з Ins_{acst} були у 16 та 30 раз нижчі, ніж у ThT (таблиця 3.10), що призвело до сильного падіння чутливості до фібрил у порівнянні з чутливістю до в'язкості. З іншого боку, K_a ICT3 у присутності F_{acst} вища, ніж у ThT, тому чутливість зонда до білка та в'язкості – у $\sim 8,5$ разів нижча, ніж ThT. Вища афінність (та флуоресцентна відповідь) ThT до Ins_{acst} може бути наслідком наявності CH_3 -групи у позиції 6, що грає важливу роль у розташуванні зонда на поверхні β -листа завдяки мінімізації стеричного відштовхування [348]. ICT2 та ICT3 мають нижчу афінність (та флуоресцентну відповідь) до амілоїдного інсуліну через відштовхування між метокси-групою у позиції 6 бензотіазольного кільця та киснем карбонільних груп β -листа [152], або завдяки наявності громіздкого замісника у позиції 4' [225]. Однак, ICT2 та ICT3 більш чутливі до полярності оточення (таблиця 3.9, I_{GL}/I_{DCM}), ніж ThT, тому їх K_a можуть бути вищі у F_{acs} .

Таким чином, ICT2 та ICT5 можна використовувати для детектування амілоїдних фібрил з варіюванням полярності, оскільки їх максимуми флуоресценції у присутності фібрил інсуліну та лізоциму відрізняються. З іншого боку, ICT2 та ICT3 мають найвищу чутливість квантових виходів флуоресценції до в'язкості оточення, тому можуть розрізняти агрегати білка з різним модулем еластичності.

4.2. Вивчення впливу рН та іонної сили на чутливість бензантронів та сквараїнів до амілоїдних фібрил лізоциму F_{acs}

На даному етапі роботи визначали чутливість спектральних параметрів бензантронів (крім тих, що мали найменшу чутливість до F_{acs} : P10, P14, AM19, FA, AM21, AM17) та сквараїнів (G6) у фібрилах F_{acs} до зміни густини поверхневого заряду фібрил, що модулювали варіацією рН та іонної сили. На рис. 4.6 та 4.7 наведені типові ізотерми зв'язування зондів з агрегатами білка, отримані при варіюванні зовнішніх умов і флуориметричному титруванні білком та зондом, відповідно. Слід зазначити, що обрані значення рН для тестування чутливості зондів (2, 4,5, 6, 7,4, 9,3, 11,4) відповідають

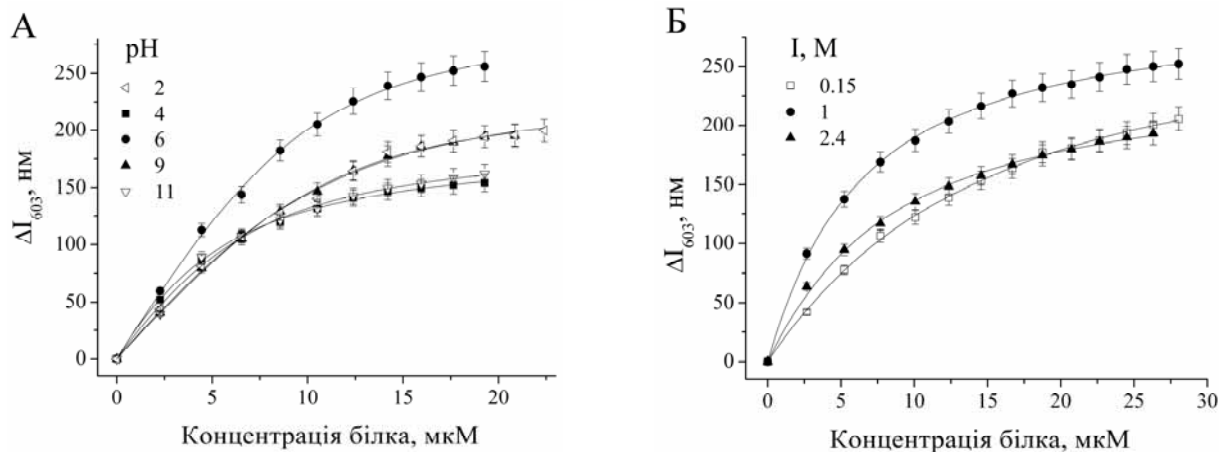


Рисунок 4.6. Ізотерми зв'язування АВМ з F_{acs} , отримані шляхом титрування зонда білком при варіюванні рН (А) та іонної сили (Б). Концентрація зонда – 0.5 мкМ

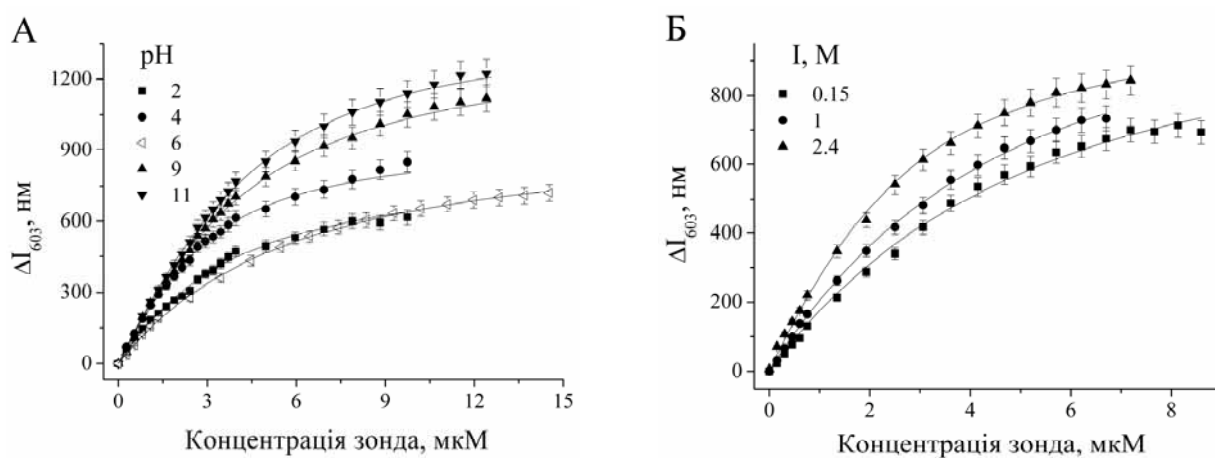


Рисунок 4.7. Ізотерми зв'язування АВМ з F_{acs} , отримані шляхом титрування білка зондом при варіюванні рН (А) та іонної сили (Б). Концентрація білка – 11 (А) та 13 мкМ (Б)

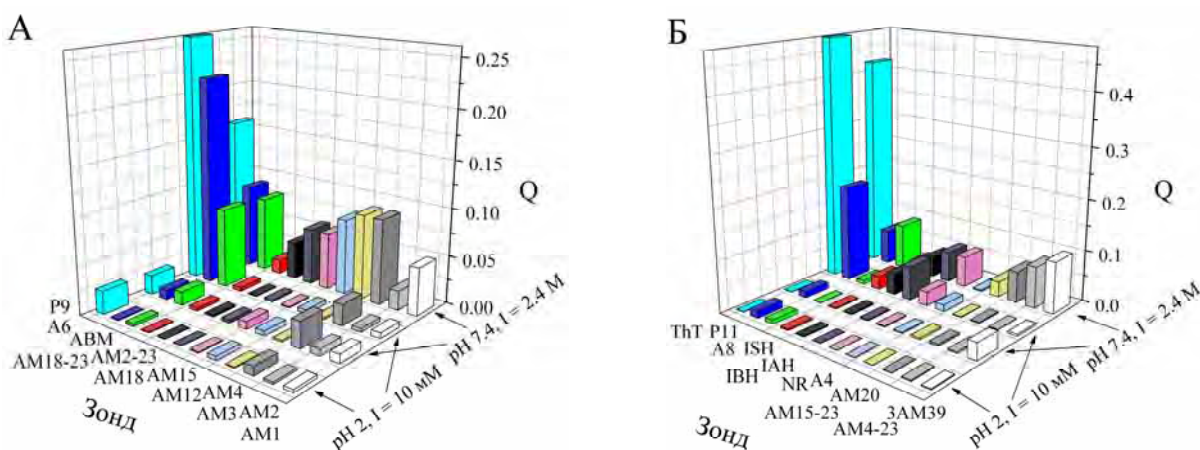


Рисунок 4.8. Залежності квантового виходу бензантронів від рН та іонної сили середовища. Близьні два ряди стовпчиків відповідають значенням квантового виходу зондів у вільному стані, дальні два ряди – у присутності амілоїдних фібрил

конформаційним перетворенням у молекулах білків, і є точками, у яких змінюється заряд амінокислот [349]. Зокрема, при рН 2 лізоцим має максимальний заряд ($Z = 17,1$), а рН 11,4 – ізоелектрична точка білка [285]. Більшість зондів у вільному стані (крім AM1, AM2, AM3, P9, A4, P11, ThT) показали зниження квантового виходу у 2–10 разів при рН 2. Також усі амідінобензантрони та A8 мали значення Q на 2 порядки нижчі у присутності фібрил при рН 2 у порівнянні з нейтральним рН (рис. 4.8, таблиця 3.2). Решта барвників мали лише у 2–3 рази нижчий Q (крім A8 та ISH, що мали такі самі значення). Раніше було отримано докази залежності спектрів поглинання амінобензантронів від рН середовища [350].

Опираючись на роботу Станевої, можна припустити існування протонованої форми амідінобензантронів при рН 2, коли протонується атом азоту, що об'єднує молекулу бензантрон у та його замісник у 3-й позиції [351]. Це призводить до блакитного зсуву максимумів флуоресценції (у нашому випадку ~до 540 нм) через зниження електрон-донорної сили замісника та кон'югації у π -електронній системі хромофора. Крім того, як уже згадували раніше, амідінобензантрони (у нашому випадку ще і A4, IBH, ISH) мають слабшу кон'югацію замісників у третій позиції з ароматичним ядром, ніж амінобензантрони, що призводило до блакитних зсувів максимумів флуоресценції в етанолі [8]. Так само, при зниженні рН середовища спостерігали блакитні зсуви максимумів поглинання у скварайну SNO_3 , що пояснюється протонуванням атому азоту молекули [306]. Зниження квантового виходу бензантронів із замісниками з низькою електрон-донорною силою спостерігали у роботі І. Грабчева [352]. Отже, спектральні властивості зондів визначаються рівнем кон'югації ядра бензантронів і його замісника у третій позиції [312,353]. Поряд з цим, АВМ мав нижчі значення квантового виходу у присутності людського сироваткового альбуміну при рН 2, ніж при рН 7.4, що узгоджується з результатами нашої роботи [10]. До зниження квантового виходу амідінобензантронів у F_{acs} при рН 2 так само призводить протонування амінозамісника. Незаряджені бензантрони, певне, мають низьку чутливість до

Таблиця 4.1

Параметри зв'язування бензантронів з амілоїдними фібрилами лізоциму (F_{acs}) при варіюванні рН середовища

Зонд	рН (заряд білка)	K_a , мкМ ⁻¹	n	рН (заряд білка)	K_a , мкМ ⁻¹	n	рН (заряд білка)	K_a , мкМ ⁻¹	n
ThT	2 (17,1)	0,30	0,02	4,5 (10)	0,37	0,02	6 (8,6)	0,47	0,05
NR		4,10	0,10		1,50	0,03		5,50	0,11
ABM		0,37	0,15		0,74	0,22		0,20	0,15
A6		0,34	0,04		0,50	0,30		0,14	0,2
P9		0,07	0,10		0,07	0,20		0,32	0,15
AM4		-	-		-	-		0,45	0,03
IAH		0,82	0,15		0,37	0,02		0,11	0,04
ThT	7,4 (7,5)	0,50	0,02	9,3 (5,3)	0,34	0,04	11,4 (-0,6)	0,50	0,05
NR		9,80	0,04		1,50	0,05		8,80	0,08
ABM		0,93	0,06		0,41	0,26		0,53	0,33
A6		0,40	0,07		0,56	0,4		0,61	0,34
P9		0,53	0,07		0,43	0,2		0,41	0,16
AM4		0,63	0,02		0,51	0,17		0,31	0,14
IAH		0,20	0,33		0,17	0,35		0,17	0,40

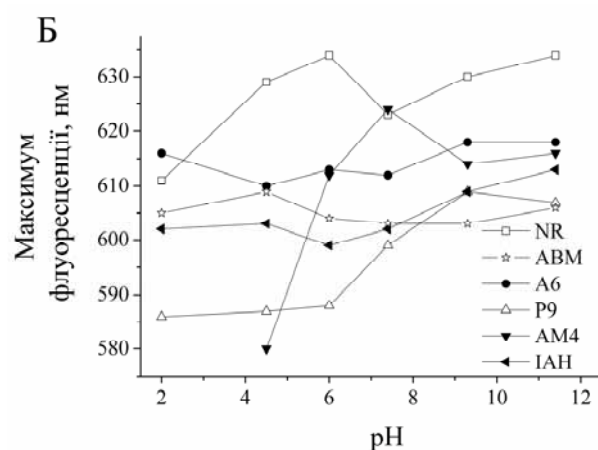
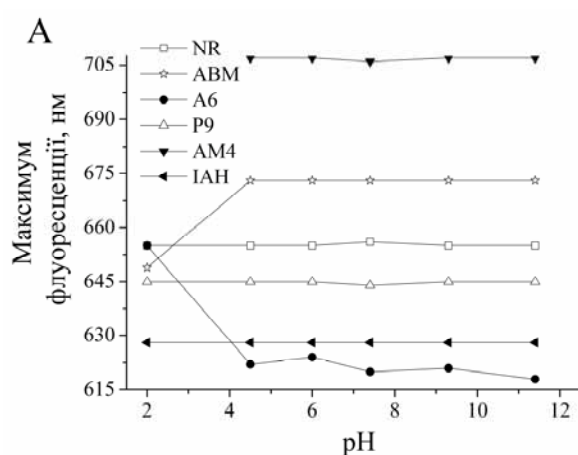


Рис. 4.9. Залежність максимумів флуоресценції вільних зондів (А) та зондів у присутності F_{acs} (Б) від рН середовища. Концентрація бензантронів – 0,5 мкМ; ThT та NR – 0,2 та 0,7 мкМ, відповідно. Концентрації білка ~20–30 мкМ (Б)

амілоїдних фібрил з високою поверхневою густиною позитивного заряду (як було показано у розділі 3.1.2 при порівнянні F_{eth} та F_{ac}). Крім того, електричне поле впливає на розподіл зарядів у молекулі зв'язаних зондів, що може призводити до зниження ступеня кон'югації між донором та акцептором і нерадіаційного згасання флуоресценції (як і полярність оточення) [92,353-355]. Також амідінобензантрони можуть просто не зв'язуватися з фібрилами білка при рН 2, бо квантові виходи вільного зонда та у присутності фібрил схожі (рис. 4.8), тобто протонування азоту замісника у третій позиції може викликати значне зниження спорідненості до агрегатів білка. Для подальшого тестування чутливості до рН обрали 4 амінобензантронів зонда (АВМ, А6, Р9, ІАН), що мали високі значення Q у F_{acs} при рН 2, а також амідінобензантрон АМ4 (параметри зв'язування зондів з амілоїдним лізоцимом при варіюванні рН наведені у таблиці 4.1). Аміно замісники АВМ, А6, Р9, Р11 можуть мати найвищу електрон-донорну силу.

Цікаво, що максимуми флуоресценції вільних зондів майже не залежали від рН, крім рН 2 для А6, АВМ, АМ4 (рис. 4.9А). При насиченні білком бензантрони характеризуються однаковими максимумами флуоресценції в діапазонах рН 2–6 або 7.4–11.4, але максимуми в останній області зсунуті на 2–15 нм у довгохвильову область (рис. 4.9Б). Отже, незважаючи на зниження густини поверхневого заряду білка, барвники локалізуються у більш полярній області, ніж при кислих рН. Можливо, це викликано посиленням гідрофобних та водневих зв'язків усередині фібрили, їх частковою агрегацією у надфібрилярні структури, зниженням кількості зв'язаного зонда та виштовхуванням його на поверхню. Дійсно, димери лізоциму з'являються при лужних рН [356]. Квантовий вихід вільних А6, АВМ, Р9, АМ4 був низьким при рН 2, зростав до рН 7,4, і навіть падав при рН 9,3 та 11,4 (крім АМ4) (рис. 4.10А). Падіння може бути зумовлене водневими зв'язками гідроксильних груп з карбонільною групою зондів (розділ 4.1.1) [87,92]. NR, ІАН, АМ4, ThT показали нижчі значення Q_0 при рН 2 (крім ThT), а при інших значеннях рН – вищі і приблизно однакові Q_0 . Дійсно, посилення водневих зв'язків з

розчинником знижує квантовий вихід NR, а також, разом з π -стекінгом, призводить, як правило, до гасіння флуоресценції зондів у кристалічному стані [221]. У присутності амілоїдного лізоциму усі бензантрони показали зниження квантового виходу у декілька разів в області pH 9,3–11,4 відносно pH 7,4, що

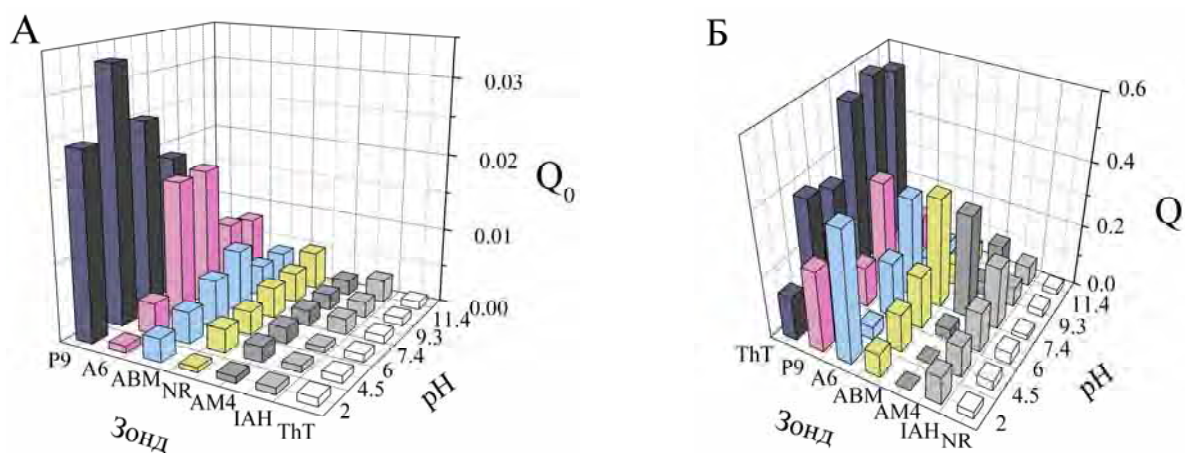


Рисунок 4.10. Залежності квантового виходу зондів у вільному стані (А) та у присутності F_{acs} (Б) від pH середовища

може свідчити про вплив водневих зв'язків та зростання полярності оточення (через часткову агрегацію фібрил білка) (рис. 4.10Б). Зокрема, зростає сила водневих зв'язків усередині білка (як показано для міоглобіну), що також може знижувати Q при зв'язуванні зонда з білком (за допомогою цих зв'язків) [357]. Зростання Q NR та ThT при pH 9–11,4 можна пояснити меншим впливом водневих зв'язків (через сильнішу кон'югацію донорної та акцепторної частин молекули) та високою чутливістю до зростання в'язкості оточення, відповідно. Константи асоціації ABM, P9, AM4, ThT, NR знижувалися при pH 9,3–11,4 (для A6 та IAH – зростали та не змінювалися, відповідно), що можна пояснити частковою агрегацією фібрил білка (таблиця 4.1). Стехіометрія зв'язування усіх зондів зростала до 4-х разів, що викликане, певне, появою додаткових сайтів зв'язування зондів через втрату заряду білком. При переході від pH 2 до 4 спостерігали значне підвищення Q , а для AM4 при переході від pH 4 до 6 – підвищення на 2 порядки. K_a ABM, AM4, ThT, P9, NR зростають в 1,7–8 разів при переході від pH 2 до 7,4, K_a IAH – знижується у 5 разів, A6 – не

змінюється. n – зростає для ІАН, А6 у 2 рази, знижується для NR, АВМ, Р9 у 2 рази, і не змінюється у АМ4, ThT. Очевидно, барвники мають вищу афінність до менш заряджених фібрил, як і до неполярних (розділи 3.1.1, 3.1.2). Це також може бути зумовлено послабленням гідрофобних, водневих взаємодій та, як наслідок, зниженням модуля еластичності фібрил при рН 2 [271,357,358]. А6 та Р9 мали аномально великі значення Q при рН 2 (0.4 та 0.3, відповідно), можливо, через найсильнішу кон'югацію між ароматичними донором та акцептором заряду, а також появою додаткових сайтів у жолобках гідрофобної області β -листа (на відміну від рН 7,4). Дійсно, якщо константи асоціації А6 у кислому середовищі та рН 7,4 схожі (а у Р9 навіть у 5 разів нижчі), то стехіометрія зв'язування зондів трохи вища при кислих рН (таблиця 4.1).

Таким чином, зниження чутливості барвників до фібрил має місце при рН 2–4 (найнижча) та 9–11 (крім ThT) відносно рН 6–7,4 (краща область для детектування F_{acs}), що викликане, в основному, зміною властивостей їх сайтів зв'язування з фібрилами. Також вільні амідіобензантрони можуть бути добрими флуоресцентними сенсорами кислого рН (2–4), при якому спостерігаються ~ 120 – 180 нм блакитні зсуви максимумів флуоресценції та падіння квантового виходу на 2 порядки. Цікаво, що сенсор рН, зонд В2, не показав зміни оптичної густини пропорційно рН, а змінювались лише максимуми поглинання [351].

Тепер розглянемо вплив іонної сили на чутливість бензантронів до F_{acs} . Спочатку досліджували 7 зондів, найменш чутливих до рН. Також обрали чотири значення іонної сили: 5 мМ (таблиця 4.2), 0,15, 1, 2,4 М (NaCl), що широко використовуються при дослідженні зв'язування зондів з білками [160,359]. Наявність солі (KCl) трохи знижує заряд лізоциму при рН 7,4 [283]. Максимуми флуоресценції вільних зондів не залежали від іонної сили, крім А6, що показав ~ 10 нм довгохвильовий зсув максимуму при $I=1$ М (через зростання сили водневих зв'язків у воді при високій іонній силі) (рис. 4.11А) [360]. Таким чином, максимум вільного А6 чутливий і до рН, і до іонної сили. У присутності F_{acs} АМ4, АВМ, Р9 показали короткохвильові (~ 10 – 18 нм) зсуви максимумів,

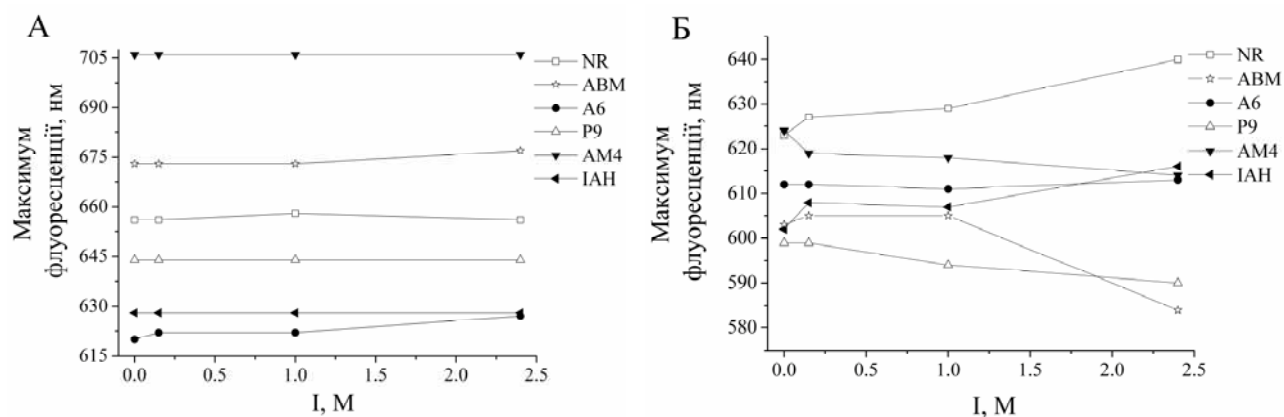


Рисунок 4.11. Залежності максимумів флуоресценції зондів у вільному стані (А) та у присутності амілоїдних фібрил (Б) від іонної сили середовища (рН 7,4)

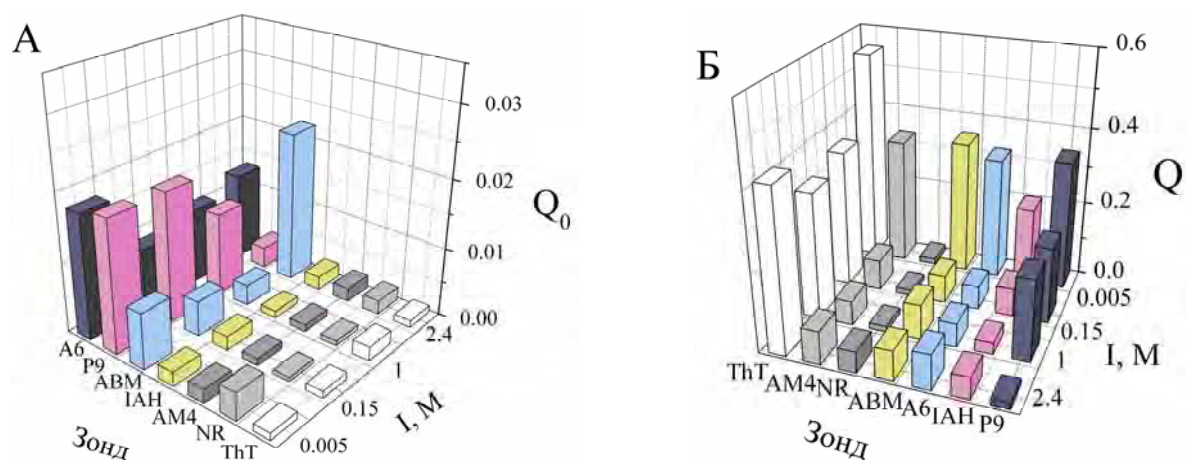


Рисунок 4.12. Залежності квантового виходу зондів у вільному стані (А) та у присутності амілоїдних фібрил (Б) від іонної сили середовища (рН 7,4)

Таблиця 4.2

Параметри зв'язування бензантронів з фібрилами лізоциму (F_{acs}) при варіюванні іонної сили середовища (рН 7,4)

Зонд	I, M	K_a , мкМ ⁻¹	n	I, M	K_a , мкМ ⁻¹	n	I, M	K_a , мкМ ⁻¹	n
ThT	0,15	0,46	0,05	1	0,61	0,07	2,4	0,57	0,05
NR		1,40	0,14		0,90	0,16		0,18	0,35
ABM		0,26	0,14		0,32	0,15		0,80	0,16
A6		0,60	0,70		0,40	0,80		0,70	0,72
P9		0,03	0,35		0,53	0,06		0,30	0,06
AM4		0,02	0,22		0,03	0,14		0,20	0,05
IAH		0,27	0,11		0,35	0,19		0,28	0,20

ІАН та NR – довгохвильові (~15–20 нм), А6 не змінив максимум (рис. 4.11Б). Ці результати свідчать про зниження полярності оточення сайтів зв'язування флуорофорів через зниження заряду білка, а у випадку ІАН, NR – зростанням полярності. Максимуми вільного та зв'язаного з F_{acs} ThT не залежали від іонної сили.

Квантові виходи вільних барвників AM4, ІАН, ThT при переході від $I=0$ М до $I=2,4$ М не змінювалися, А6, Р9, NR – знижувались у ~2–6 разів, АВМ – зростав у 3 рази (рис. 4.12А). Тобто кон'югація між донором та акцептором А6, Р9, NR знижується за рахунок підвищення сили водневих зв'язків у буфері за високої іонної сили розчину (показано за допомогою квантово-хімічних розрахунків), а АВМ – зростає [360]. Q зондів у присутності F_{acs} знижується при високій іонній силі у 1,3–5 разів відносно $I=0$ М, а у NR – зростає при $I=2,4$ М у ~4 рази (рис. 4.12Б). Зниження Q спостерігали поряд зі зниженням K_a зондів AM4, Р9, АВМ у ~ 1,2–2 рази (у А6 K_a зростала, у ThT, ІАН – не змінювалася), а також зниженням n ІАН в 1,5 рази (можливо, через зростання полярності оточення) (таблиця 4.2). n А6, Р9, AM4 не змінювався, а ThT, NR, АВМ – зростав у ~ 2–7 разів. При збільшенні концентрації солі проходить екранування позитивного заряду білка іонами NaCl та зростання гідрофобних взаємодій у макромолекулі [361,362]. Зокрема, сила гідрофобних зв'язків та стабільність білків зростають внаслідок підвищення поверхневого натягу води у присутності неорганічних солей, як виходить з термодинамічних розрахунків В. Меландера [363]. Тому отримані зниження квантового виходу уже при $I=0.15$ несподівані, оскільки, як правило, посилення гідрофобних взаємодій між лігандом та білком (або усередині білка) призводять до стабілізації комплексів або нативної структури білка. Наприклад, це показано для: а) β -лактамази за допомогою кругового дихроїзму, флуоресценції залишків триптофану, динамічного світлорозсіювання; б) комплексу таніна з полі-L-проліном за допомогою хроматографії [361,364]. Таким чином, лише NR, що чутливий до полярності оточення, показав очікуване зростання квантового виходу флуоресценції при $I=2,4$ М відносно $I=5$ мМ [87]. Слід зауважити, що зміни

параметрів зв'язування та максимумів флуоресценції АВМ та А6, ІАН при зростанні іонної сили – протилежні (як і при зміні рН). Зокрема, АВМ мав більшу чутливість K_a та n до змін середовища, оскільки цей зонд імовірно локалізується у зарядженому жолобку, і послаблення електростатичних взаємодій у білку впливає на параметри зв'язування. Дійсно, у роботі Камати показана різна чутливість антитіл LG.51 та 21B3 до іонної сили: зв'язування із зарядженими та нейтральними залишками амінокислот призводило до високої та низької чутливості їх комплексів з β -лактоглобуліном до іонної сили, відповідно [362]. Зниження квантового виходу бензантронів можна пояснити, як і у випадку вільних зондів, зниженням кон'югації між донором та акцептором (А6, Р9, NR) та частковою агрегацією фібрил лізоциму.

Таким чином, зонд NR виявився більш чутливим до фібрил при високій іонній силі, а решта зондів – при низькій, причому Q падає уже при $I=0,15$ М, а при подальшому зростанні іонної сили його значення не змінюються. Падіння квантового виходу усіх зондів, при $I=0,15$ М відносно $I=5$ мМ, не спостерігається через значне зростання гідрофобних взаємодій між зондом та білком і відсутністю подальшого зростання щільності пакування філаментів у фібрилах. Тому найкраща область для детектування F_{acs} – при іонній силі, що не перевищує 0,15 М.

На наступному етапі роботи визначали залежність чутливості сквараїнового зонда G6 до F_{acs} та $I_{sn_{acs}}$ від рН та іонної сили. У роботі Кадіми наведено залежність заряду інсуліну від рН середовища ($I=0,1$ М), де рН 2, 4,5, 6, 7,4, 9,3 та 11,4 відповідають заряди (на мономер) 5, 2, 0,5, -2, -4 та -8,5, відповідно [365]. Максимуми флуоресценції вільного G6 не залежали від рН та іонної сили середовища (рис. 4.13). Квантовий вихід вільного G6 у присутності F_{acs} , як і у бензантронів, падав при переході від рН 7,4 до рН 2 у 3 рази, і у 2 рази – при переході від рН 7,4 до лужних значень рН (таблиця 4.3), а при зростанні іонної сили з 1 до 2,4 М Q_0 знижувався у 3 рази (таблиця 4.4). Примітно, що максимуми флуоресценції багатьох рН-сенсорів на основі сквараїнів також не залежать від рН. Наприклад, протонування PO_3^- групи

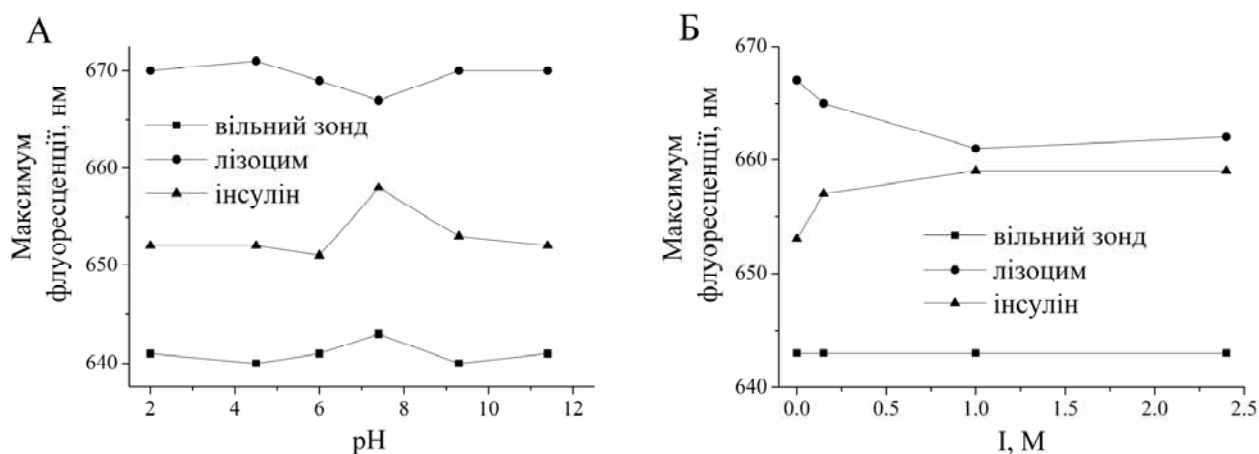


Рисунок 4.13. Залежності максимумів флуоресценції G6 у вільному стані та у присутності амілоїдних фібрил від рН (А) та іонної сили (Б) середовища

Таблиця 4.3

Характеристики зв'язування G6 з фібрилами лізоциму (F_{acs}) та інсуліну (Ins_{acs}) при варіюванні рН середовища

Білок	рН	K_a , мкМ^{-1}	n	Q_0	Q	Білок	рН	K_a , мкМ^{-1}	n	Q
Лізоцим	2	10	0,020	0,005	0,40	Інсулін	2	26	0,009	0,12
	4,5	29	0,024	0,009	0,30		4,5	60	0,010	0,20
	6	11	0,020	0,007	0,20		6	44	0,005	0,09
	7,4	25	0,024	0,014	0,22		7,4	105	0,008	0,12
	9,3	13	0,036	0,006	0,14		9,3	3	0,035	0,28
	11,4	17	0,024	0,008	0,20		11,4	10	0,029	0,26

Таблиця 4.4

Характеристики зв'язування G6 з фібрилами лізоциму (F_{acs}) та інсуліну (Ins_{acs}) при варіюванні іонної сили середовища

Білок	I, M	K_a , мкМ^{-1}	n	Q_0	Q	Білок	I, M	K_a , мкМ^{-1}	n	Q
Лізоцим	0,15	4,5	0,07	0,0020	0,13	Інсулін	0,15	16	0,007	0,16
	1	6	0,03	0,0020	0,08		1	49	0,01	0,09
	2,4	20	0,04	0,0007	0,05		2,4	16	0,01	0,02

лужному рН розчину може бути викликано нейтралізацію заряду азоту у донорі молекули при рН 9–11 (як і для хемосенсора з ОН-групою) та протонуванням кисню центрального кільця зонда при кислому рН. Останнє спостерігали у незарядженого зонда S_{ju} , що також супроводжувалось зниженням оптичної густини у декілька разів та батохромним зсувом максимуму поглинання на ~ 100 нм [306]. Агрегація зондів не спостерігається при зниженні рН, оскільки немає відповідних змін у спектрах флуоресценції барвників [366]. У присутності F_{acs} максимумами флуоресценції сквараїнів не змінювались при варіюванні рН, крім рН 7,4, де вони зсунуті у блакитну область на 3 нм у лізоцимі та у червону область на 8 нм в інсуліні. При цьому Q у F_{acs} знижується у 2 рази при переході від рН 2 до рН 7,4 (K_a та n при цьому змінюються неоднозначно, але їх значення відрізняються не більше ніж у 2 рази), а в Ins_{acs} – зростає у 2 рази при лужних значеннях рН (таблиця 4.3). Також Q G6 у F_{acs} знижується у 4 рази при підвищенні іонної сили до 2,4 М, а у Ins_{acs} – у 6 разів. Оскільки при кислому та лужному значеннях рН лізоцим та інсулін мають найбільші за модулем значення зарядів, а при зростанні іонної сили посилюються гідрофобні взаємодії, можна припустити, що електростатичні зв'язки грають значну роль у зв'язуванні G6 з амілоїдними фібрилами, коли кон'югація Д–А–Д структури порушена. Квантовий вихід цвіттеріонних сквараїнів з нормальною кон'югацією Д–А–Д структури більш чутливий до в'язкості, і електростатичні взаємодії для цих зондів не дуже характерні [214]. Таким чином, зниження Q у фібрилах при $I=2,4$ М можна пояснити нейтралізацією заряду атому азоту донора молекули, що призводить до зниження K_a у ~ 5 разів (n зростає у лізоцимі на порядок, а в інсуліні – на 50%). Через такі самі зміни структури G6 при лужному значенні рН, зонд у присутності Ins_{acs} має на порядок нижчі значення K_a та у 5 разів вищі значення n , ніж при рН 7,4. У Ins_{acs} при рН 9,3–11,4 заряд інсуліну найбільший, що може призводити до зниження щільності пакування філаментів та в'язкості оточення зонда. Вочевидь, з цієї причини G6 з нейтральним зарядом азоту донора має високу чутливість до негативно зарядженого білка. Окрім цього, можуть

утворюватись водневі зв'язки між ОН- групами та атомом кисню центрального кільця, що стабілізує іонний характер зонда [368]. Таким чином, сквараїни можуть завищувати концентрацію амілоїдних фібрил у кислих та лужних середовищах для білків з високими значеннями позитивного та негативного зарядів, відповідно, а також занижувати – при високих значеннях іонної сили. Ці результати означають, що оптимальна область використання сквараїнів для детектування амілоїдних фібрил F_{acs} та Ins_{acs} – рН 6–7,4 і невисокі значення іонної сили (як і у бензантронів).

4.3. Висновки

1. Дослідження спектральних властивостей нових зондів у середовищах з різною полярністю та в'язкістю виявило вищі значення квантового виходу сквараїнів G6, G7 та похідних ThT – ICT2, ICT3, у гліцерині, ніж у дихлорметані, а у бензантронів – нижчі. Вища чутливість сквараїнів до в'язкості оточення може пояснити їх вищу чутливість до амілоїдних фібрил лізоциму, ніж у ThT. Бензантрони, що були найбільш специфічні до фібрил лізоциму F_{acs} , мали найкращу чутливість до полярності оточення.

2. Аналіз зв'язування бензантронів та цвіттеріонного сквараїну G6 з фібрилами лізоциму F_{acs} та інсуліну Ins_{acs} при варіюванні рН та іонної сили середовища показав, що найкращою областю детектування фібрил є значення рН 7,4 та іонної сили менше 0,15 М. При цьому нові зонди були здатні детектувати зміни морфології фібрил, викликані локальними змінами рН та іонної сили.

РОЗДІЛ 5

КВАНТОВО-ХІМІЧНІ РОЗРАХУНКИ БЕНЗАНТРОНОВИХ, СКВАРАЇНОВИХ ЗОНДІВ ТА ПОХІДНИХ ТІОФЛАВІНУ Т

Використання квантово-хімічних дескрипторів дозволяє оцінити геометричну форму та активність/властивості молекул (наприклад, ефективність ліків чи зв'язування лігандів з білком) тільки на основі їх структури [369]. Пошук кореляції між квантово-хімічними дескрипторами та експериментальними характеристиками молекул лежить в основі QSAR/ QSPR-аналізу (кількісне співвідношення структура-активність/властивість) [370]. Зокрема, метод був дуже ефективний у прогнозуванні значень коефіцієнту розподілу октанол–вода для N-арілзаміщених похідних антранілової кислоти [371]. Окрім цього, у роботі Д.І. Іншина за допомогою QSAR-аналізу було відібрано для синтезу кращі ціанінові маркери фібрилізації α -синуклеїну, що було підтверджено флуоресцентними вимірюваннями [372]. У роботі К. Цісек (К. Чена) цей метод використовували для пошуку взаємодій «білок-зонд», що зумовлюють чутливість похідних ThT (транс-стільбенових похідних) до амілоїдних фібрил лізоциму, інсуліну та $A\beta_{1-40}$, та визначення їх потенційних сайтів зв'язування з амілоїдними фібрилами [226,373]. QSAR-аналіз також застосовувався для пошуку кращих ціанінових інгібіторів фібрилізації інсуліну та у прогнозуванні активності протиракових агентів з групи поліциклічних тіопірано-[2,3-d]-таїзолів [374,375].

Квантово-хімічні дескриптори, що використовують для розробки теоретичних моделей, мають фізичну природу, а незалежних дескрипторів існує близько 200. Наприклад, дескриптор «заряди на атомах» характеризує реактивну здатність молекул, полярність та електростатичні взаємодії [369].

У даній роботі розраховували квантово-хімічні дескриптори різного типу. Типи дескрипторів та методи їх розрахунку наведені у розділі 2.7.

5.1. QSAR аналіз нових флуорофорів

Дескриптори просторової структури бензантронів: довжина (L), ширина (W) та висота (H), коливаються у межах 1,1 – 1,9 нм, 0,7 – 1,1 нм та 0,2 – 0,7 нм, відповідно, а для ThT вони становлять 1,5, 0,6 та 0,4 нм, відповідно (таблиця 5.1) [155]. Таким чином, розміри нових зондів і ThT схожі, що підтверджує ідею про асоціацію бензантронів із жолобками фібрил. Теоретично розраховані довжини хвиль максимумів поглинання флуорофорів у газовій фазі (значення ΔE_e , виражені у нм) становили 415 – 497 нм, що на 5 – 34 нм менше, ніж експериментальні значення в етанолі (таблиця 5.2). Теоретичні значення дипольних моментів основного (μ_g) та збудженого (μ_e) станів для AM3, AM4, ABM виявились набагато вищі за експериментальні, отримані групою Кірілової за допомогою сольватохромного методу ($\mu_g = 0,97, 2,04, 2,67$ Д; $\mu_e = 6,12, 6,37, 6,2$ Д, відповідно), хоча відношення між значеннями були подібні (таблиця 5.2) [9]. У роботі С. Гонти отримано дуже високі дипольні моменти амідінобензантронів ($\mu_g \sim 6,4\text{--}10,4$ Д) за допомогою методу ZINDO/S [8]. Однак визначені у цій роботі значення μ_g, μ_e схожі на ті, що розраховані П. Капустою для амінопохідних бензантронів ABa та ABaAc методом INDO/S (μ_g 5 та 4.3 Д; μ_e 9,4 та 7,1 Д, відповідно) та групою О.М. Кірілової [9,353]. Таким чином, INDO/S та B3LYP/6-31G(d,p) є найбільш оптимальними для розрахунку μ_g та μ_e бензантронів.

Зміни дипольних моментів ($\mu_e - \mu_g$) більшості флуорофорів при збудженні складали 3,3 – 6,3 Д (таблиця 5.2). Цих значень достатньо, щоб викликати значні ефекти ЧЗМФ у NBD-мічених фосфоліпідах та триптофані [320,331]. Крім того, P10, P11, AM17 та 3AM39 показали найвищі зміни дипольного моменту $\sim 9,5 - 22,3$ Д. Різниці $\mu_e - \mu_g$ для AM19, FA складали 2,7 та 1,6 Д, відповідно. Ці результати корелюють з високою чутливістю 3AM39, P11 до F_{acs} та найнижчою – у AM19, FA (розділ 3.1.1). Дійсно, зміна дипольних моментів впливає на чутливість барвників до полярності оточення, що зумовлює їх специфічність до амілоїдних фібрил [92,319]. Зміна значень ЧЗМФ бензантронів визначається переважно характеристиками їх сайтів зв'язування

Таблиця 5.1

Квантово-хімічні характеристики бензантронових зондів (PM6, MOPAC)

Зонд	CA , \AA^2	CV , \AA^3	E_{HOMO} , eV	E_{LUMO} , eV	L , \AA	$\sum Q(N)$	$\sum Q(C)$	$CLogP$	W , \AA	H , \AA	P , \AA^3
A6	319	368	-8,0	-1,1	12,9	-0,30	-1,99	6,27	7,1	3,5	43,4
AM1	387	460	-8,5	-1,3	13,4	-0,72	-2,16	6,23	8,3	7,2	50,7
AM2	335	380	-8,3	-1,1	13,9	-0,78	-1,61	3,95	7,2	4,6	44,0
AM3	323	358	-8,3	-1,2	13,8	-0,7	-1,30	3,96	7,5	3,6	42,5
AM4	362	416	-8,1	-1,1	14,8	-0,51	-1,61	4,68	7,6	4,0	46,7
AM12	373	426	-8,3	-1,2	15,3	-0,49	-1,68	5,32	7,8	3,8	44,0
AM15	355	403	-8,1	-1,1	13,2	-0,84	-1,72	4,70	9,2	3,7	47,4
AM18	374	427	-8,3	-1,3	15,9	-0,47	-1,59	5,52	7,1	3,4	49,3
AM2- 23	347	407	-8,4	-1,4	13,9	-0,74	-1,45	4,80	7,4	4,7	47,1
AM21	324	357	-8,5	-1,2	13,9	-0,95	-1,25	4,15	7,2	2,8	41,2
P9	358	411	-8,5	-1,3	15,8	-0,67	-2,00	4,98	7,4	3,8	45,5
AM18- 23	395	454	-8,6	-1,5	16,1	-0,70	-1,41	5,27	7,8	3,8	54,9
A8	340	390	-8,5	-1,3	14,5	-0,63	-1,80	4,49	6,8	3,8	43,6
P10	389	455	-8,4	-1,4	16,7	-0,63	-2,26	6,62	7,6	4,7	52,3
P11	365	425	-8,5	-1,3	14,5	-0,62	-2,20	5,33	8,2	4,8	46,6
P14	430	507	-8,8	-1,4	18,2	-0,68	-2,62	6,47	7,4	4,3	54,8
A4	451	550	-8,4	-1,3	18,7	-0,43	-3,84	7,94	8,7	3,8	54,6
IAH	373	431	-8,5	-1,3	12,1	-0,42	-1,75	5,85	11,4	4,2	47,9
IBH	343	399	-8,5	-1,3	11,3	-0,42	-1,80	5,76	8,3	2,8	44,6
ISH	359	407	-8,3	-1,2	15,7	-0,42	-1,5	5,28	7,2	2,5	46,8
AM19	279	312	-8,6	-1,3	11,4	-0,98	-0,63	3,38	6,9	2,6	36,2
FA	278	308	-9,0	-1,7	11,7	-0,37	-0,51	3,87	6,9	2,2	35,8
ABM	312	359	-8,2	-1,3	11,8	-0,29	-1,36	4,52	7,9	3,4	41,9
AM17	363	411	-8,6	-1,5	13,9	-0,92	-1,55	6,07	7,6	6,3	46,3
3AM39	347	387	-8,4	-1,5	13,9	-0,68	-1,14	4,65	8,1	1,9	47,0
AM4- 23	371	445	-8,4	-1,3	13,9	-0,85	-1,93	5,61	7,2	4,7	50,9
AM20	318	357	-8,4	-1,2	13,4	-0,79	-1,32	3,77	6,8	4,4	40,9
AM15- 23	365	526	-8,4	-1,4	13,4	-0,75	-1,62	5,33	7,4	5,2	49,7

Таблиця 5.2

Квантово-хімічні характеристики бензантронових зондів (6-31G (d, p), GAMESS)

Зонд	μ_g , Д	μ_e , Д	E_g , Хартрі	f	ΔE_e , см ⁻¹	E_e , Хартрі	φ , град.	q_g^{benz}	q_e^{benz}
A6	5,36	10,94	-979,2	0,21	22592	-979	24,5	0,14	0,20
AM1	6,44	10,24	-1188	0,264	22487	-1189	94,3	0,1	-0,022
AM2	8,03	12,06	-995,2	0,352	22665	-995	44	0,12	0,003
AM3	6,42	9,77	-956	0,289	22891	-956	-132,3	0,13	0,022
AM4	8,2	12,33	-1074	0,369	22479	-1074	-43,9	0,12	-0,01
AM12	6,99	11,03	-1147,6	0,388	23116	-1147	-45	0,16	0,059
AM15	6,76	10,23	-1035	0,292	22979	-1034	-126,1	0,12	0,012
AM18	5,79	9,55	-1147,6	0,343	22745	-1147	130	0,16	0,066
AM2-23	5,67	9,3	-3568	0,233	22955	-3568	106,1	0,062	-0,034
AM21	8,27	12,03	-956	0,358	23012	-956	-33	0,15	0,057
P9	5,26	11,54	-1074	0,215	22084	-1074	23,4	0,14	0,18
AM18-23	4,95	9,18	-3721	0,298	22729	-3721	124,5	0,1	-0,025
A8	5,12	11,41	-1034,5	0,21	22028	-1034	25,1	0,14	0,19
P10	4,31	20,62	-1226	0,141	20156	-1226	26,9	0,23	0,21
P11	4,94	17,51	-1112	0,153	20156	-1112	27,3	0,18	0,23
P14	5,67	10,94	-1305	0,249	22269	-1305	15,4	0,19	0,24
A4	4,97	8,23	-1291,3	0,214	22592	-1291	-124	0,14	0,037
IAH	5,96	10,08	-1169	0,254	23124	-1169	-111,7	0,17	0,050
IBH	5,54	9,40	-1054	0,244	23149	-1054	-113,6	0,16	0,046
ISH	6,27	10,25	-1129	0,236	23366	-1129	-107,9	0,15	0,028
AM19	5,43	8,09	-877,4	0,213	23100	-877	-118	0,31	0,22
FA	3,53	5,12	-897,3	0,173	24149	-897	-130	0,44	0,38
ABM	3,83	9,82	-1015	0,204	22165	-1015	24	0,19	0,25
AM17	3,84	26,1	-1109	0,009	21931	-1109	-113,6	0,16	-0,63
3AM39	5,15	14,66	-3529,1	0,254	21326	-3539	20,5	0,22	-0,05
AM4-23	5,67	9,56	-3647	0,249	22624	-3647	-115,2	0,064	-0,05
AM20	6,76	9,84	-956	0,248	22866	-956	-118	0,11	-0,08
AM15-23	5,57	9,47	-3608	0,259	22955	-3608	-121,9	0,082	-0,02

на фібрилах, що підтверджує припущення розділу 3.2. Це видно при порівнянні $\chi_{\text{ЗМФ}}$ та $\mu_e - \mu_g$: високі ($\sim 5,3 - 22,3$ Д) та низькі ($\sim 1,6 - 4,23$ Д) значення $\mu_e - \mu_g$ мали А6, Р9, А8, Р11, Р14, АВМ, АМ17 та АМ1, АМ2, АМ21, АМ18-23, А4, ІSH, АМ19, FА, АМ4-23, АМ20 та АМ15-23, відповідно. Але обидві групи зондів показали високі $\chi_{\text{ЗМФ}}$, тобто вони локалізуються у гідрофільних жолобках (розділ 3.2). З іншого боку, низькі значення $\chi_{\text{ЗМФ}}$ спостерігались для бензантронів АМ3, АМ4, АМ12, АМ15, АМ18, АМ2-23, ІАН, ІВН ($\mu_e - \mu_g \sim 3,4 - 4,1$ Д) та Р10, ЗАМ39 ($\mu_e - \mu_g \sim 9,5 - 16,3$ Д). Цікаво, що $\mu_e - \mu_g$ амідінобензантронів та ІАН, ІВН, ІSH, FА становлять $\sim 3,1 - 4,2$ Д, тобто нижчі, ніж у амінобензантронів. Крім того, різниця зарядів молекули бензантрон у збудженому та основному станах ($q_e^{\text{benz}} - q_g^{\text{benz}}$) становила $\sim 0,04 - 0,06$ для аміно-, а для амідінобензантронів – $\sim -0,1 - -0,27$ (це свідчить про те, що у газовій фазі у амінобензантронів донором є не замісник у третій позиції, а молекула бензантрон). Отже, ступінь кон'югації та електрон-донорна сила неароматичних N-алкілів у третій позиції А6, АВМ, Р9, Р11 (зокрема, піперидину, морфоліну, похідних піперазину, відповідно) з бензантровою частиною молекули (що включає акцептор, карбонільну групу) – найвищі. Цікаво, що φ – двогранний кут між бензантроном та його замісником у позиції С-3 коливався у широких межах ($-132 - 130^\circ$). При цьому для аміно похідних (крім А4, ІАН, ІВН, ІSH, FА) він становив $17 - 27^\circ$. Це пояснює сильнішу кон'югацію Д–А системи у амінобензантронів (хоча у деяких випадках при збудженні зонда торсійний кут знижується з 90° до нуля) [376]. З цієї причини спостерігається вище значення квантового виходу цих зондів при кислих рН та відсутність блакитних зсувів флуоресценції при зв'язуванні з гліцерином (розділ 4). Цікаво, що незважаючи на те, що сила осцилятора для амідінобензантронів ($0,21 - 0,388$) трохи вища, ніж для амінобензантронів ($0,15 - 0,25$), як правило, їх квантовий вихід у вільному стані нижчий, ніж у амінобензантронів, а у присутності фібрил – вищий, що може бути пов'язано з інтенсивними водневими зв'язками амідіно похідних з розчинником. Це спостерігається, зокрема, для ІАН, АМ4, ІВН, АМ12, А4, ЗАМ39, АМ15, АМ2-23, АМ18-23 – найбільш чутливих барвників до F_{acs} . Серед амінобензантронів

тільки АВМ, певне, має непланарну конформацію при збудженні, і тому високу чутливість до фібрил. Усі вищезазначені зонди – найбільш чутливі до в'язкості та полярності оточення (як показано у попередніх розділах). Отже, полярність та в'язкість оточення можуть змінювати двогранний кут, посилюючи таким чином кон'югацію між донором та акцептором, і чутливість до F_{acs} .

Цікаво, що амінобензантрони (крім АВМ, А8, Р9), мають вищі значення ліпофільності, ніж амідінобензантрони ($CLogP$), але це не корелює з чутливістю зондів до полярності оточення (можливо, через обмеженість теоретичних методів розрахунку $CLogP$). В цілому, розраховані значення $CLogP$ для незаряджених бензантронів були достатньо високими, як і у, наприклад, фенотіазинів (~4 – 6), алпренолола, пропанолола, тіоакрідина (~3 – 3.77) [377,378].

Далі цікаво порівняти квантово-хімічні дескриптори бензантронів та сквараїнових зондів. Енергії E_{HOMO} становили -9 – -8 та -7,3 – 5,1 еВ для бензантронів та сквараїнів, відповідно; енергії E_{LUMO} : -1,7 – -1,1 та -2,0 – 0,34 еВ, відповідно (таблиці 5.1, 5.3). Таким чином, відстань між цими енергетичними рівнями дорівнює ~6,9 – 7,3 та ~4,76 – 5,3 еВ для бензантронів та сквараїнів, відповідно. Вищі значення E_{LUMO} G1, G2, G6 (на ~20–50%, ніж у бензантронів) узгоджуються з їх вищою чутливістю до нуклеофільних атак, а менші значення відстаней $E_{LUMO} - E_{HOMO}$ – означають нижчу стабільність молекул [218,311,369]. Примітно, що ці значення були вищі, ніж у багатьох інших сквараїнів ($E_{LUMO} - E_{HOMO}$ ~2,0 – 3,45) [304,379]. Сквараїнові барвники G6 та G2 мали дуже низькі значення $\mu_e - \mu_g$ (~0,7 – 2,72 нм), тому ЧЗМФ сквараїнів не вимірювали (таблиця 5.4). Значення $CLogP$ для незаряджених сквараїнів також були високими. Двогранні кути між довгими вуглеводневими замісниками у тіазоловій (нафталеновій) частині донора та центральним циклобутановим кільцем G1, G2, G5 складали ~82 – 98°, що пояснює їх нижчу специфічність до фібрил інсуліну Ins_{ac} та лізоциму F_{ac} , ніж у випадку G6 та G7. Зонд G6 має найменш громіздку донорну частину, тому характеризується не лише паралельним розташуванням донора та акцептора в основному стані ($\varphi = 0^\circ$), але і планарною структурою донорів (таблиця 5.4). Це також пояснює

Таблиця 5.3

Квантово-хімічні характеристики сквараїнових зондів, ThT, NR (PM6, MOPAC)

Зонд	CA , \AA^2	CV , \AA^3	E_{HOMO} , eV	E_{LUMO} , eV	L , \AA	$\sum Q(N)$	$\sum Q(C)$	$CLogP$ ($MLOGP$)	W , \AA	H , \AA
G1	588	701	-7,135	-2,063	18	-0,38	-1,37	3,81	13,2	7,5
G2	492	569	-7,101	-2,044	16,3	-1,6	-0,35	0,96	14,3	4,1
G4	455	522	-5,084	0,342	16,7	-0,32	-1,84	2,54	9,8	3,2
G5	502	573	-5,265	-0,823	18,6	-0,35	-2,83	2,32	12,3	4,4
G6	448	533	-7,257	-1,983	15	-0,38	-2,66	4,2	11,7	2
G7	563	694	-5,744	-0,017	19,8	-0,37	4,49	3,91	10,8	4,6

одну з найвищих специфічностей барвника до фібрил інсуліну та лізоциму. Слід зауважити, що значення двогранного кута між донорами та акцептором були близько нуля для усіх сквараїнів в основному стані, у порівнянні з бензантронами, де φ коливався у широких межах $-132 - 130^\circ$.

Таблиця 5.4

Квантово-хімічні характеристики сквараїнових зондів, ThT, NR (6-31G (d, p), GAMESS)

Зонд	μ_g , Д	μ_e , Д	E_g , Хартрі	f	ΔE_e , см ⁻¹	E_e , Хартрі	φ , град.	q_g^D	q_e^D
G1	3,31	2,84	-2742,306	0,226	14131	-2742,235	-2	0,44	0,24
G2	1,54	3,87	-2319,323	0,332	14438	-2319,249	-0,6	0,45	0,29
G4	26,6	-	-1849,259	-	-	-	-0,2	-0,54	-
G5	34,7	-	-2323,730	-	-	-	-0,7	-0,54	-
G6	4,11	4,79	-4235,668	0,115	14712	-4235,594	1,3	0,41	0,20
G7	24,0	-	-5055,255	-	-	-	1,2	-0,94	-

Крім того, зміни дипольних моментів G1 та G6 при збудженні складали 0,5 – 0,7 Д, що недостатньо для того, щоб викликати ЧЗМФ, та корелює з низьким значенням Стоксових зсувів зондів [320,321]. Дійсно, високі значення дипольних моментів основного стану багатьох симетричних (і часто – із замісником у центральному кільці) сквараїнів (завдяки їх C_{2v} симетрії) майже не змінювались при збудженні [380,381]. Значення μ_g G1, G2 та G6 були

подібні до розрахованих кластерним методом SAC-CI (що враховує електронні кореляції) значень інших сквараїнів ($\sim 0,3 - 1,94$ Д, для сполук 1, 1c, 1d, 2, 3), але сполуки, що мають замісники у центральному кільці, мали значно вищі μ_g ($\geq 6,5$ Д, наприклад сполуки 1a, 1b, 1e, 2a, 3a) [382]. У роботі К.Й. Лоу також стверджується, що структура Д-А-Д молекули сквараїну може призвести до практично нульових значень дипольного моменту [383]. Дійсно, симетричні сквараїни без замісників у центральному кільці мають, як правило, значення μ_g , близькі до нуля (сольватохромні ефекти зонди відчують за рахунок змін квадрупольних моментів) [303,380,384]. У нашій роботі симетричні G1 та G2 мали найнижчі значення μ_g у порівнянні з несиметричними сполуками (таблиця 5.4), як і розраховані методом AM1 у роботі С.Н. Нізамова [322]. З іншого боку, виходячи зі спектральних характеристик сквараїнів у модельних фосфоліпідних мембранах, а також з експериментальних значень μ_g у диоксані $\sim 4,3 - 6,4$ Д (для сквараїнів із замісниками у центральному кільці), можна припустити, що для них характерні вищі значення μ_g , ніж отримані у даній роботі [215,384]. Розрахунки енергій збудження у газовій фазі дають завищені значення максимумів поглинання ($\sim 682 - 710$ нм, якщо перевести значення ΔE_e у нм), у порівнянні з розчинами зондів у ДМСО ($\sim 649 - 682$ нм). Сила осцилятора у G6 нижча, ніж у G1 та G2, а кон'югація Д-А-Д структури та/ або електрон-донорна сила зондів схожі (при збудженні сумарний заряд донорів змінився однаково). Характеристики заряджених зондів G4, G5 та G7 у збудженому стані розрахувати не вдалося, а в основному стані вони мають дуже високі значення дипольних моментів основного стану ($\sim 24 - 35$ Д), що означає недостатню точність розрахунків у базисі 6-31G (d,p). Зауважимо, що такі самі високі значення μ_g були розраховані методом AM1 для деяких несиметричних аніонних сквараїнів, але метод AM1 менш точний, ніж 6-31G (d,p) [322].

На наступному етапі роботи був проведений QSAR аналіз залежності чутливості бензантронових барвників від розрахованих квантово-хімічних

дескрипторів (таблиці 5.1, 5.2). QSAR аналіз для 28 амінобензантронових зондів полягав у проведенні часткової регресії найменших квадратів (PLSR) (у програмному пакеті PLS, <http://www.vcclab.org/lab/pls/>) [385]. Цей двостадійний метод дозволяє обрати із загальної кількості дескрипторів лінійні комбінації тих, що мають найвищі значення коефіцієнту кореляції з експериментальним параметром, і з них побудувати теоретичну модель. Тобто, на відміну від полілінійного регресійного аналізу (MLR), у методі PLSR параметрами виступають не окремі дескриптори, а їх лінійні комбінації. PLSR має суттєву перевагу над MLR через: а) виключення можливості появи моделі з високим коефіцієнтом кореляції та нульовою передбачувальною здатністю (якщо кількість параметрів моделі невиправдано висока); б) вищі значення коефіцієнтів кореляції (стабільність) теоретично розрахованого параметра з експериментальним параметром; в) здатність генерувати добру модель навіть у випадку, коли число дескрипторів набагато вище за число експериментальних точок (зондів), а значення дескрипторів можуть корелювати між собою [386].

Перед PLSR аналізом бензантрони розділили на дві групи: ті, що мають значення $I/I_0 \geq 20$ (AM18-23, 3AM39, AM15-23, AM12, AM2-23, AM2, AM15, AM4, ISH, ABM, IBH, IAH, A4) (кращі маркери для амілоїдних фібрил лізоциму та інсуліну, розділ 3), та решта, що показали відносно низьку чутливість до амілоїдних фібрил $F_{acs} - I/I_0 < 20$ (FA, AM19, P10, AM17, AM21, P14, A8, AM4-23, AM20, P11, AM1, AM3, P9, A6, AM18) (таблиця 3.2) [372]. Слід відзначити, що зонди групи $I/I_0 \geq 20$: AM12, AM15, AM18, ABM, 3AM39, AM15-23, AM2-23 і зонди P9, A6, виявилися найбільш чутливими до модельних ліпідних мембран, як показано у роботах О.А. Житняківської [387,388]. Для кожної групи на основі попереднього лінійного кореляційного аналізу обрали дескриптори, коефіцієнти кореляції яких з параметром I/I_0 були вищі за 0.6, і ті, що їх взаємні коефіцієнти кореляції були нижчі 0.9 [372]. Для першої групи зондів такими дескрипторами були тільки $\sum Q(N)$, $\sum Q(C)$, $CLogP$, W (їх значення коефіцієнтів кореляції становили 0,62, -0,74, 0,77, 0,64, відповідно); а для другої – тільки E_{HOMO} , E_{LUMO} , q_g^{benz} (їх значення коефіцієнтів кореляції були 0,64,

0,60, -0,61, відповідно). Отриманий набір дескрипторів аналізували методом часткової регресії найменших квадратів (PLSR) [372,389]. PLSR дозволяє отримати лінійну модель (що відображає залежність експериментального параметра від групи квантово-хімічних дескрипторів) з найкращою передбачувальною здатністю (та оптимальною кількістю дескрипторів).

На рис. 5.1 зображено залежності теоретичних оцінок I/I_0 від експериментальних значень для найкращих моделей. Для зондів, чутливих до F_{acs} (рис. 5.1А), отримали добру (стабільну) модель з високими коефіцієнтами: кореляції – $RY = 0.946$; та Фішера – $FtY = 42.19$ (модель є статистично значущою через вище значення $FtY = 42.19$ у порівнянні з табличним $FtY = 3.84$). Загальна середня абсолютна похибка моделі $MYE = 10.646$. Загальна стандартна абсолютна похибка залишків $SD2Y = 0.127$. Також, модель є узгодженою, оскільки значення $MSECV$ (середньоквадратична похибка крос-валідації) та $SD2Y$ схожі, тобто при зростанні числа зондів значення $MSECV$ (розраховане для виключеного набору зондів) наближається до значення $SD2Y$ (розраховане для усього набору зондів) [226]. Крім того, отримана модель має відмінну передбачувальну здатність – $Q^2 = 0.804$, середньоквадратичне відхилення крос-валідації $RMS_{cv} = 0.442$, та дисперсію крос-валідації $MSECV = 0.196$. Рівняння для I/I_0 складається з компонентів, що не корелюють між собою (крім $\sum Q(C)$ та $CLogP$). Розрахунки статистичних параметрів описано у Додатку А.

Краща модель для нечутливих до F_{acs} барвників має слабку кореляцію з експериментальними даними, дуже високе значення $MYE = 3.564$; низьку передбачувальну здатність $Q^2 = 0.446$, вищі значення RMS_{cv} та $MSECV$; $SD2Y = 0.567$ (модель є узгодженою); значення критерію Фішера, що відповідає статистично значущій моделі (рис. 5.1Б). Рівняння для I/I_0 складається з компонентів, що слабо корелюють між собою (дескриптори належать до різних груп). Вклад I_j дескрипторів групи чутливих до F_{acs} зондів у величину I/I_0 був майже однаковим: 0,35, -0,4, 0,32, 0,49 для $\sum Q(N)$, $\sum Q(C)$, $CLogP$, W . Отримана модель для $I/I_0 \geq 20$ більш стабільна та має кращу передбачувальну здатність, ніж, наприклад, модель для чутливості похідних

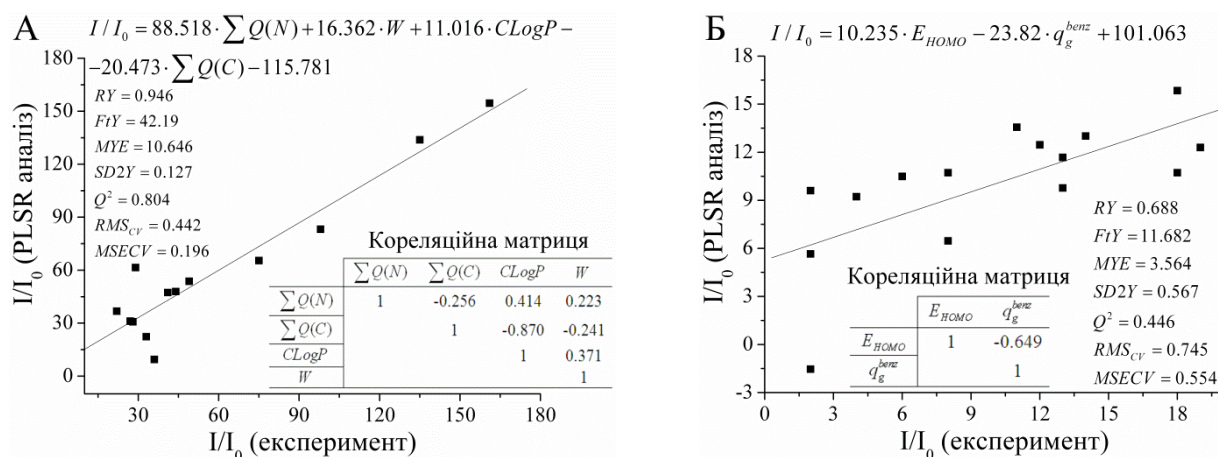


Рисунок 5.1. Залежності теоретично розрахованих значень I/I_0 від експериментальних, для бензантронів: AM18-23, 3AM39, AM15-23, AM12, AM2-23, AM2, AM15, AM4, ISH, ABM, IBH, IAH, A4 ($I/I_0 \geq 20$) (А); та FA, AM19, P10, AM17, AM21, P14, A8, AM4-23, AM20, P11, AM1, AM3, P9, A6, AM18 ($I/I_0 < 20$) (Б). Отримані рівняння, статистика моделей та кореляційні матриці для двох груп зондів також наведені на рисунку

ThT до фібрил $A\beta_{1-40}$ та інсуліну ($RY \sim 0.73, Q^2 \sim 0.61$) та транс-стільбенових похідних до β -амілоїдних бляшок ($RY = 0.857$) [226,372].

На основі аналізу вкладів різних дескрипторів, можна зробити такі висновки: а) зростання W означає позитивний вплив стеричних і ароматичних взаємодій з F_{acs} (значення дескрипторів, що прямо описують ароматичність не розраховували у роботі) на значення I/I_0 ; б) зростання $CLogP$ свідчить про позитивний вплив гідрофобних взаємодій на значення I/I_0 ; в) зростання $\sum Q(N)$ (~збільшенню заряду донора) $\sim I/I_0$; г) зниження модуля $\sum Q(C)$ (~зниженню заряду бензантрової частини зонда) $\sim I/I_0$ [390]. Таким чином, чутливість зондів з $I/I_0 \geq 20$ до F_{acs} залежить від сили гідрофобних та ароматичних взаємодій, а також, певною мірою, від значень різниці зарядів донора та бензантрової частини зонда в основному стані ($\sim \mu_g$). Слід зауважити, що вклад гідрофобних взаємодій в отриманій у даній роботі моделі приблизно дорівнює сумарному вкладу стеричних та ароматичних взаємодій (оскільки два останні види взаємодій «заховані» у параметрі W). Наявність

кореляції з $\sum Q(N)$ означає, що величина I/I_0 пропорційна до електрон-донорної сили замісника у позиції С-3. Електрон-донорна сила цієї групи визначає спектральні властивості бензантронів: висока електрон-донорна сила означає вищу чутливість до полярності та в'язкості оточення [312,325]. Дійсно, найкращі потенційні амілоїдні маркери бензантронного ряду можуть зв'язуватись з фібрилами за допомогою гідрофобних, ароматичних, ван-дер-Ваальсових (диполь-дипольних, індукційних), іон-дипольних та водневих зв'язків (від інтенсивності цих зв'язків залежать спектральні властивості зондів), що підтверджується даними ІРПЕ (розділ 3.3): чутливі до F_{acs} барвники зв'язуються із жолобками, утвореними ароматичними, полярними та зарядженими залишками амінокислот [323,325]. Важливим є той факт, що наприклад, АМ4, А4, ІАН, ІВН, ІШН показали вищу чутливість до фібрил лізоциму, ніж АМ12, АМ15, АМ2-23, АМ18-23. Так само і параметр Q_{DCM}/Q_0 був в 1,5 – 6 разів вищий для першої підгрупи зондів, що підтверджує отриману теоретично кореляцію чутливості зондів з $I/I_0 \geq 20$ до F_{acs} з параметром $CLogP$ (розділи 3, 4).

В цілому, QSAR-модель для бензантронів з $I/I_0 \geq 20$ подібна, наприклад, до моделі К. Цісек, у якій зростання $CLogP$ та μ_g знижує концентрацію похідних ThT, необхідну для гасіння половини флуоресценції ThT (за рахунок конкурентного зв'язування) у присутності фібрил інсуліну та $A\beta_{1-40}$, тобто підвищує афінність зондів до фібрил [226]. Тепер розглянемо параметри отриманої моделі більш детально.

Зростання $I/I_0 \sim W$ бензантронів з $I/I_0 \geq 20$ можна пояснити, по-перше, роллю стеричних взаємодій, тобто чутливістю зондів до в'язкості оточення. Дійсно, стеричні взаємодії збільшують квантовий вихід зв'язаних з амілоїдними фібрилами ThT та його похідних та ціанінових зондів. Це показано різними методами зокрема, для ThT та олігомерів $\beta 2$ -мікроглобуліну; також – для ThT та амілоїдних сферулітів інсуліну (β -лактоглобуліну) та амілоїдогенних фрагментів Sup35 пріонного білка дріжджів [386,188].

Аналогічні дані отримано для РІВ, нейтральної похідної ThT, та протофібрил Аβ-пептиду; і для ціанінових зондів та фібрилярного α-синуклеїну [166,240]. Зростання $I/I_0 \sim W$ бензантронів з $I/I_0 \geq 20$ також свідчить про роль ароматичних взаємодій зондів з F_{acs} (оскільки зонди АВМ, ІАН, ІВН, що мають ароматичні замісники у С-3 положенні або найвищу ліпофільність – А4, ніж інші барвники групи $I/I_0 \geq 20$). Роль ароматичних (π-стекингових) та гідрофобних залишків є ключовою у визначенні афінності до амілоїдних фібрил, наприклад ThT. За допомогою молекулярного докінгу Біанкаланою продемонстровано, що ThT найкраще зв'язується із жолобком, утвореним залишками тирозину та лейцину; роль ароматичних взаємодій у зв'язуванні ThT з олігомерами β-лактоглобуліну показано Л.С. Вольфе за допомогою аналізу ко-кристалів зонда з білком [97,114,157,299]. Роль ароматичних взаємодій CR з Аβ-пептидом та з амілоїдогенними димерами інсуліну показано К. Йокоюмою та Й. Поратом [132, 391].

Кореляція чутливості бензантронів до F_{acs} зі зростанням розділення зарядів між донорною та бензантровою частиною молекули ($\sim \mu_g$), свідчить про позитивний вплив ван-дер-Ваальсових (диполь-дипольних, індукційних) та іон-дипольних взаємодій між барвником та амілоїдними фібрилами. Таким чином, електронна стабілізація комплексу «білок-зонд» відіграє значну роль, як, наприклад, було виявлено для афінності нейтральних транс-стільбенових похідних до амілоїдних фібрил Аβ-пептиду (що корелює із зарядом транс-стільбенового сегменту) за допомогою QSAR аналізу (іон-дипольні взаємодії); та афінності РІВ, нейтральної похідної ThT, до протофібрил Аβ-пептиду (методом молекулярно-динамічного моделювання, диполь-дипольні взаємодії) [166,373]. Зростання афінності зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами разом із силою ван-дер-Ваальсових взаємодій показано для CR та нейтральної похідної ThT – РІВ з амілоїдогенним фрагментом Sup35 пріонного білка дріжджів та протофібрилами Аβ-пептиду, відповідно (за допомогою молекулярно-динамічного моделювання) [124,166]. Також електронна стабілізація (іон-дипольні взаємодії) підвищує чутливість ThT до олігомерів β2-

мікроглобуліну, що показано за допомогою аналізу ко-кристалів ThT [299]. Позитивну роль електростатичних взаємодій продемонстровано для зв'язування CR та фібрил HET's; інсуліну та полі-L-лізину; протофібрил пептиду A β ₉₋₄₀ [115,116, 392]. Слід зауважити, що зростання різниці зарядів між донором та бензантроною частиною зонда може призвести до утворення нефлуоресцентного стану ТІСТ бензантронів, зниження їх квантового виходу у полярному розчиннику (таблиця 3.1), тому значення I/I_0 додатково підвищиться через дестабілізацію стану ТІСТ (формування ТІСТ у полярному розчиннику характерно для зондів АНС та NR, чутливих до полярності оточення) [140,221]. Крім того, сумарний вклад ван-дер-Ваальсових, іон-дипольних (з урахуванням формування стану ТІСТ при зростанні дипольного моменту зондів) дорівнює сумарному вкладу гідрофобних, ароматичних та стеричних взаємодій (вклади дескрипторів наведені вище). Таким чином, ван-дер-Ваальсові, іон-дипольні взаємодії, що пропорційні до електрон-донорної сили замісника у позиції С-3), та гідрофобні взаємодії відіграють більш значну роль у визначенні чутливості зондів до F_{acs} , ніж ароматичні та стеричні взаємодії (що узгоджується з даними розділу 4, тобто вищою чутливістю бензантронів до полярності, ніж до в'язкості оточення). Незважаючи на значний вплив як гідрофобності (ароматичності), так і ван-дер-Ваальсових (іон-дипольних) взаємодій, більшість зондів з $I/I_0 \geq 20$ локалізуються у сайтах з найнижчою полярністю (за даними ЧЗМФ та блакитних зсувів максимумів флуоресценції). Це свідчить про посилення гідрофобного ефекту відносно електронної стабілізації при зв'язуванні флуорофорів з білком (у присутності полярного розчинника гідрофобні ефекти значно вищі, ніж у газовій фазі) [393,394].

Певне, що водневі зв'язки між зондами та фібрилами слабші, ніж у протон-донорних розчинниках, і тому не впливають на чутливість барвників до F_{acs} : оскільки не спостерігалось блакитних зсувів максимумів флуоресценції амідінобензантронів відносно аміно похідних (як у гліцерині та етанолі). З іншого боку, ці зв'язки можуть підвищувати афінність бензантронів до

агрегатів лізоциму. Окрім цього, N-H групи (донори водневих зв'язків) нейтральних та заряджених похідних ThT і CR підвищували афінність до A β -фібрил за рахунок водневих зв'язків з білком [395,396].

Вклад дескрипторів E_{HOMO} , q_g^{benz} у модель для зондів, що мають низьку чутливість до F_{acs} ($I/I_0 < 20$), складає 0,602, -0,527, відповідно. Таким чином, зниження заряду бензантронової частини зонда (з урахуванням заряду акцептора) (~електрон-донорній силі замісника у положенні C-3 і зростанню μ_g , тобто диполь-дипольних, іон-дипольних взаємодій та вірогідності формування стану TICT (оскільки заряд карбонільної групи був однаковий для усіх барвників, крім AM18) та зростання енергії E_{HOMO} (посилення нуклеофільних властивостей зонда, що може сприяти формуванню π -стекінгових взаємодій між зондом з високою електрон-донорною силою та ароматичними залишками амінокислот) сприяють зростанню чутливості бензантронів до F_{acs} [393]. Дійсно, кореляції E_{HOMO} та заряду транс-стільбенового сегменту з його афінністю до A β -бляшок виявили формування π -стекінгу та комплексів з переносом заряду між зондами та фенольними кільцями бокових залишків амінокислот [397]. Однак, зниження E_{HOMO} (і нуклеофільних властивостей) призводило до зростання активності N-фенілантранілінових кислот, інгібіторів фібрилізації A β -пептиду, як показано Афантісісом методом QSAR аналізу [398]. На відміну від чутливих до F_{acs} бензантронів, стеричні та гідрофобні взаємодії грають несуттєву роль у чутливості зондів з $I/I_0 < 20$ (зонди локалізувались, як правило, у найбільш полярних жолобках, показано у розділі 3 за допомогою ЧЗМФ та блакитних зсувів максимумів флуоресценції відносно буфера). Дійсно, ці зонди мають у ~1,3 – 60 разів нижчі зростання квантового виходу у неполярному DCM відносно буфера, ніж бензантрони з $I/I_0 \geq 20$ (розділ 4). Таким чином, на основі аналізу отриманих моделей можна проводити попередній відбір інших похідних бензантрона, що мають найвищі значення $CLogP$ та суму зарядів на атомах азоту замісника у позиції C-3, для синтезу якісних амілоїдних маркерів. У зондів сквараїнового ряду спостерігали слабку кореляцію між I/I_0 та просторовими дескрипторами і дескрипторами електронної структури.

Наприклад, $RY = -0.63(-0.57)$ для пар I/I_0 та H у F_{ac} (Ins_{ac}), що свідчить про негативний вклад громіздких замісників у донорній частині зондів у їх чутливість до фібрил лізоциму та інсуліну.

5.2. Залежність фотофізичних властивостей похідних тіофлавіну Т від торсійних кутів між бензотіазольним та фенольним кільцями

Для того, щоб пояснити різну чутливість груп ICT2, ICT3, ThT та ICT4, ICT5 до амілоїдних фібрил та в'язкості (полярності) мікрооточення, доцільним було дослідити вплив торсійних рухів бензотіазольного та фенольного кілець на фотофізичні властивості зондів за допомогою квантово-хімічних розрахунків. Такі розрахунки здійснювали саме для похідних молекулярного ротора ThT, оскільки вони мали високу чутливість до в'язкості оточення, на відміну від бензантронових зондів (розділ 4). Спочатку було проаналізовано профілі потенційної енергії основного стану зондів уздовж торсійних кутів φ , ψ та ξ методом AM1 (типові графіки наведені на рис. 5.2). По-перше, вони співпадали з профілями ThT (форма та значення енергії), отриманими у цій роботі та у роботі Цяпури [140]. Більш точна оцінка енергетичних бар'єрів переходу з планарної ($\varphi = 0^\circ$) у закручену ($\varphi = 90^\circ$) конформацію (рис.5.3), була проведена за допомогою базису 6-31G (d, p), як показано у таблицях 5.5 та 5.6

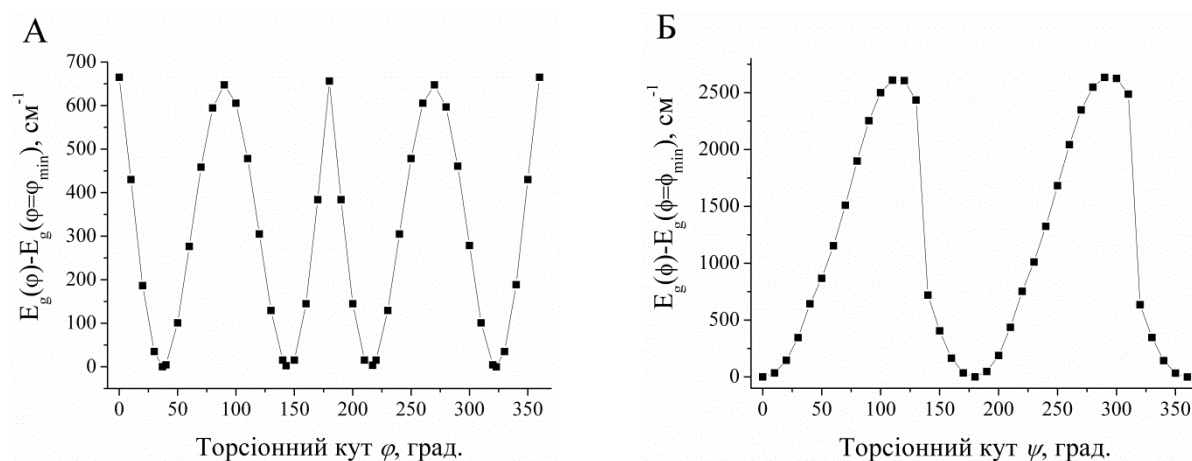


Рисунок 5.2. Залежності енергії основного стану ICT2 від торсійних кутів φ (А) та ψ (В). Розрахунки здійснювали методом AM1, з додатковими поляризаційною функцією на атомах водню, а також додатковими поляризаційною та дифузійною функціями на важких атомах

($E_{g(\varphi=0)} - E_{g(\varphi=\varphi_{\min})}$ та $E_{g(\varphi=90)} - E_{g(\varphi=\varphi_{\min})}$, що відповідають бар'ерам досягнення планарної та закрученої конформацій, відповідно). Отримані енергетичні бар'єри для закручених та планарних конформацій зондів, крім ICT4, в основному стані мають близькі невисокі значення (таблиці 5.5, 5.6). Залежності конформерів від торсійного кута φ мають мінімуми при $\varphi = 0, 180, 360^\circ$ завдяки кон'югаційним ефектам (рис. 5.2Б) [140]. Ці профілі були схожі для усіх зондів (крім ICT5) (значення бар'єрів становили $\sim 2100\text{--}2600\text{ см}^{-1}$). На основі квантово-

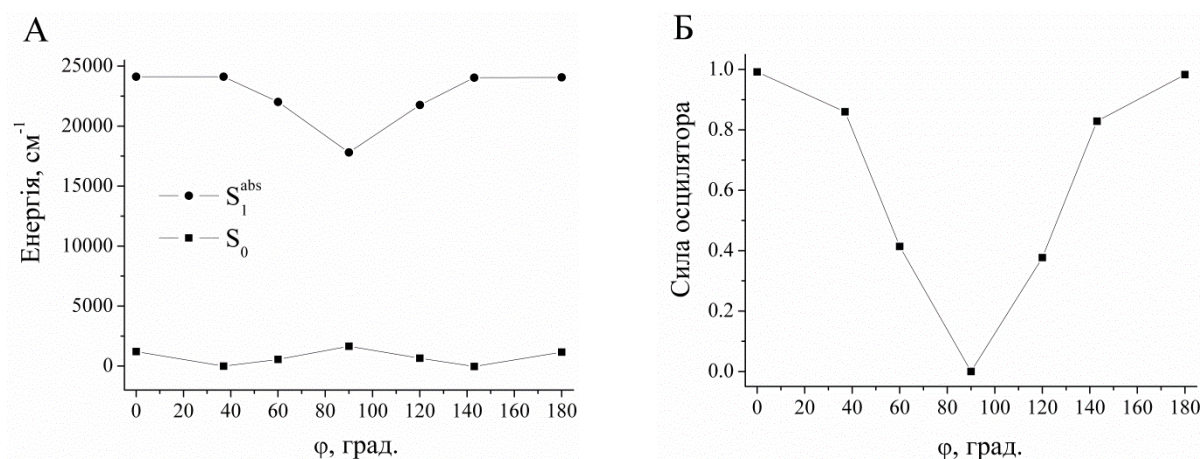


Рисунок 5.3. Властивості основного стану S_0 та першого збудженого станів S_1^{abs} конформерів ICT2 з різними кутами φ (базис DFT(TDDFT)/B3LYP/6-31G (d, p))

Таблиця 5.5

Значення енергії, дипольних моментів, заряду бензотіазольного кільця та сили осцилятора похідних ThT у станах S_0 та S_1^{abs} при $\varphi = \varphi_{\min}$

Зонд	$E_{g(\varphi=0)} - E_{g(\varphi=\varphi_{\min})}, \text{ см}^{-1}$	$\Delta E_e, (\text{см}^{-1}, \text{ нм})$	$\mu_g, \text{ Д}$	$\mu_e, \text{ Д}$	q_g	q_e	$f(\varphi = \varphi_{\min}; \varphi = 0)$
ThT	1218	24399, 410	2,3	6,5	0,59	0,42	0,80; 1,00
ICT2	1208	24117, 415	3,7	6,1	0,60	0,46	0,86; 0,99
ICT3	1272	24326, 411	5,4	2,7	0,59	0,34	0,79; 0,96
ICT4	1864	22955, 436	2,0	9,3	0,63	0,36	0,49; 0,89
ICT5	1578	27561, 363	2,1	3,8	0,65	0,43	0,61; 0,71

хімічних розрахунків профілів потенційної енергії зробили висновок, що внутрішнє обертання через зміну торсійних кутів ψ та ξ (для ICT4), навряд чи призводить до формування стану TICT. Це завдяки у 2 – 4 рази вищим бар'єрам для цих торсійних рухів у порівнянні з бар'єрами відносного обертання бензотіазольного та фенольного кілець (кут φ). Наше припущення

Таблиця 5.6

Значення енергії, дипольних моментів, заряду бензотіазольного кільця та сили осцилятора похідних ThT у станах S_0 та S_1^{abs} при $\varphi = 90$

Зонд	$E_{g(\varphi=90)} - E_{g(\varphi=\varphi_{min})}$, см^{-1}	ΔE_e , $(\text{см}^{-1}, \text{нм})$	μ_g , Д	μ_e , Д	q_g	q_e	f
ThT	1748	17632, 567	2,5	16,2	0,71	0,12	0,00
ICT2	1651	17809, 562	3,3	17,5	0,72	0,12	0,00
ICT3	1731	17744, 564	8,3	10,6	0,72	0,12	0,00
ICT4	1717	17640, 567	1,6	16,3	0,71	0,12	0,00
ICT5	1077	23568, 424	4,0	12,2	0,74	0,16	0,00

підтверджується ще і тим, що, наприклад, взаємне обертання диметиламіногрупи та фенольного кільця навколо зв'язку C-N (що відповідає торсійному куту ψ) у родамінових зондів (сполуки 241 та 242) викликало на 2 порядки нижче гасіння флуоресценції, ніж обертання цілої анілінової групи [314]. У подальшому ми обмежили розрахунки інтервалом $\varphi = 0 - 180^\circ$ через симетричну форму профілів потенційної енергії (рис. 5.3А).

Розрахунки дипольних моментів (μ_g / μ_e), зарядів бензотіазольного кільця (q_g / q_e), енергії збудженого стану (ΔE_{ex}) та сили осцилятора (f) для електронних переходів $S_0 \rightarrow S_1^{abs}$ конформерів з фіксованими значеннями кутів φ , здійснювали у базисі 6-31G(d,p) (рис. 5.3-5.5). Дані, отримані методами CIS та TDDFT(B3LYP), були близькі до результатів В.І. Цяпури, отриманих для ThT за допомогою CIS/3-21G та INDO/S, відповідно [140]. Також енергії вертикальних електронних переходів зондів були схожі на ті, що отримано

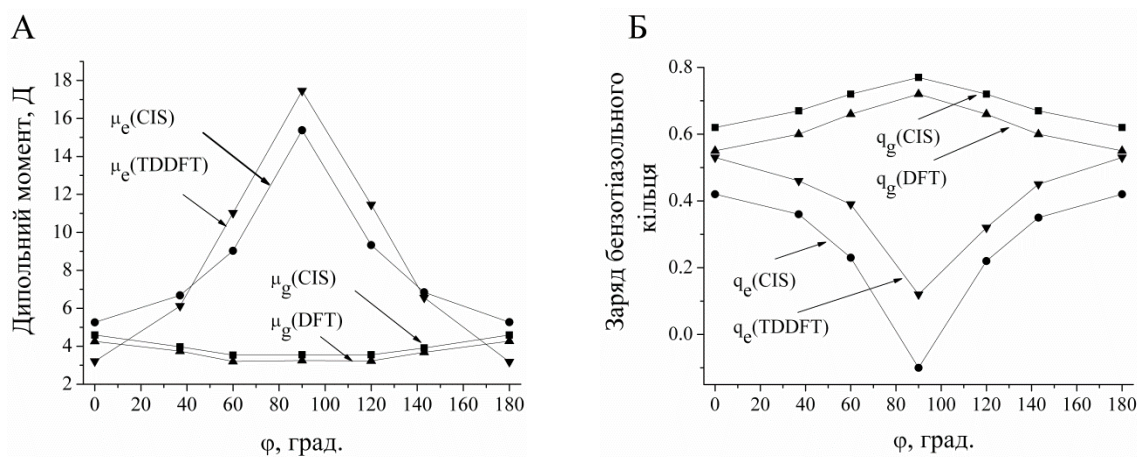


Рисунок 5.4. Властивості основного стану S_0 та першого збудженого станів S_1^{abs} конформерів ICT2 з різними кутами ϕ (базис 6-31G (d, p))

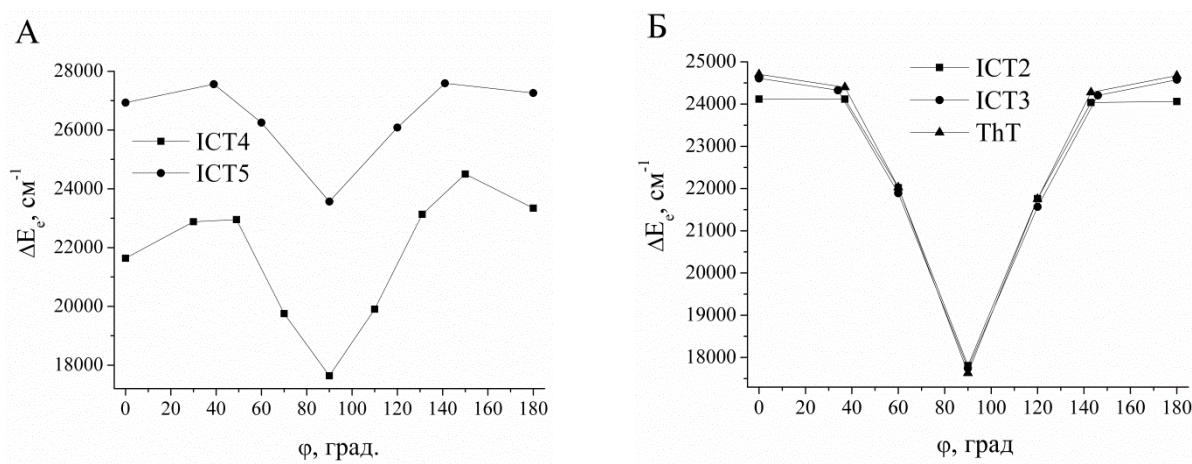


Рисунок 5.5. Енергії першого збудженого стану (ΔE_e) конформерів ICT4, ICT5 (А) та ICT2, ICT3, ThT (Б) з різними кутами ϕ (базис DFT(TDDFT)/B3LYP/6-31G (d, p))

експериментально, хоча трохи занижені (таблиця 3.10, λ_0 , таблиця 5.6, ΔE_e). Цікаво, що μ_e зондів ICT3 та ICT5, розраховані методом CIS/6-31G(d,p), були нижчі за значення μ_g . Розрахунки, проведені за допомогою TDDFT(B3LYP), дали кращі результати (таблиці 5.5, 5.6). Як видно з рис. 5.3А, енергія першого синглетного збудженого стану ICT2 має мінімум при $\phi = 90^\circ$, збільшуючи вірогідність відносного обертання бензотіазольного та фенольного кілець (тобто коли ϕ зростає від 37° , що відповідає мінімуму енергії основного стану, до 90°). Закручена конформація зонда призводить до зникнення π -кон'югації

між бензотіазольним та фенольним кільцями, знижуючи силу осцилятора до нуля (флуоресценція у цьому стані заборонена правилом «мінімального перекриття») (рис. 5.3Б). Крім того, дипольні моменти ICT2 зростають разом зі зниженням заряду бензотіазольного кільця при збудженні (рис. 5.4). Найбільші значення q_e були для конформеру з $\varphi = 90^\circ$, тому і величина μ_e при такому значенні кута також була найбільша (таблиця 5.6) [112]. Конформер ICT2 з $\varphi = 90^\circ$ має стабілізуватись при релаксації зонда у полярному розчиннику, у порівнянні з $\varphi = 37^\circ$, оскільки зростання енергії сольватації (її значення пропорційне до μ_e) знижує енергетичний рівень TICT [312,399]. В цілому, всі зонди показали схожі

залежності вищезазначених фотофізичних властивостей від торсійного кута φ (таблиці 5.5, 5.6). Наші розрахунки свідчать про те, що внутрішньомолекулярний перенос заряду при збудженні зондів дійсно має місце, а дипольні моменти зазнають значних змін (за винятком ICT3 та ICT5), що призводить до формування низькоенергетичного стану TICT у порівнянні з LE [112]. Утворення закручених конформацій нових флуорофорів при збудженні є вірогідним, оскільки у профілях потенційної енергії уздовж кута φ спостерігались локальні мінімуми для таких конформацій (рис. 5.3А). Стан TICT не є флуоресцентним, оскільки сила осцилятора при електронних переходах $S_0 \rightarrow S_1^{abs}$ дорівнює нулю, а у спектрах поглинання немає другого максимуму, що зсунутий у червону область відносно основного максимуму (таблиця 5.6, таблиця 2.3).

Нарешті, на основі квантово-хімічних розрахунків, можна пояснити, чому нові зонди, особливо ICT4 та ICT5, мають до 3880 разів вищі значення квантового виходу флуоресценції у буфері, ніж ThT (таблиця 3.10, Q_0). Як видно з таблиць 5.5 та 5.6, енергії станів LE зондів (крім ICT5) нижчі, ніж у ThT, а енергії TICT, навпаки, вищі, тому при збудженні барвників, вочевидь, відбувається краща стабілізація частково закручених конформерів та дестабілізація закручених конформерів, подібно до іншої похідної ThT, ВТА-2

[138]. Зростання енергії ТІСТ може мати місце завдяки слабшій електрон-донорній силі фенольного кільця замісників ІСТ3 та ІСТ5, або електрон-акцепторній силі бензотіазольного кільця ІСТ2, або ж стеричних обмежень у ІСТ4 [312,313]. Більш того, енергетичні профілі збудженого стану найбільш яскравих зондів, ІСТ4 та ІСТ5, були подібні до ВТА-2. Зокрема, вони мали 3 мінімуми, що відповідають конфомерам з кутами $\varphi = 0^\circ$, $\varphi = 180^\circ$ та $\varphi = 90^\circ$, на відміну від інших флуорофорів, що їх енергія мінімальна лише для конфомерів з $\varphi = 90^\circ$ (рис. 5.5). Мінімуми при $\varphi = 0^\circ$ та $\varphi = 180^\circ$ можуть відповідати станам LE, тобто зонди можуть приймати планарну конформацію при збудженні. Окрім цього, бар'єри для внутрішньомолекулярного обертання з $\varphi = 0^\circ$ до $\varphi = 90^\circ$ становили 1315 та 630 см^{-1} для ІСТ4 та ІСТ5, відповідно, що корелювало з квантовими виходами цих зондів у буфері (таблиця 3.10, Q_0). Зниження популяції стану ТІСТ для ІСТ4 та ІСТ5 підтверджується тим фактом, що конфomers з $\varphi = 0^\circ$ та $\varphi = \varphi_{\min}$ мають найнижчі значення f (таблиця 5.5). Очевидно, стани LE ІСТ2 та ІСТ3 грають важливу роль у фотофізиці цих флуорофорів, хоча вони менш стабільні, ніж у ІСТ4 та ІСТ5, і знаходяться на енергетичному плато, що відповідає конфомерам з $\varphi = 0-40^\circ$ або $\varphi = 140-180^\circ$ (рис. 5.5Б) [138]. Цим можна пояснити нижчі значення квантового виходу зондів ІСТ2 та ІСТ3 у вільному стані (таблиця 3.10, Q_0).

Стабільність станів LE означає низьку чутливість зондів до в'язкості мікрооточення [400,401], як і показано у розділі 4 для похідних ThT у порівнянні з ThT. Схожі результати отримано для ВТА-0, ВТА-1 та ВТА-2, що мають яскраву флуоресценцію у буфері, нижчу флуоресцентну відповідь у присутності А β фібрил, та вищу афінність до агрегатів білка [168]. Це означає, що фотофізичні властивості похідних ThT визначаються стабільними станами LE. Зокрема, енергетичні бар'єри для формування закрученої конформації внутрішньомолекулярного переносу заряду для нових зондів можуть бути зумовлені наступними факторами: а) стеричними обмеженнями для обертальної ізомеризації [400]; б) нижчими значеннями дипольних моментів основного

стану LE у порівнянні з TICT [140]; в) слабшими змінами дипольних моментів при збудженні [112]. Дійсно, стеричні взаємодії між громіздкими замісниками бензотіазольного кільця та атомами водню фенольного кільця ICT4 обмежують внутрішньомолекулярне обертання зонда. Крім того, ICT4 може мати не закручену (близьку до планарної) конформацію у збудженому стані завдяки дуже високим значенням μ_e при $\varphi = \varphi_{\min}$. З іншого боку, дипольні моменти основного стану ICT3 та ICT5 при $\varphi = \varphi_{\min}$, що нижчі, ніж при $\varphi = 90^\circ$, а також найменші зміни цих значень при збудженні, означають стабільність станів LE цих зондів (таблиці 5.5, 5.6) [112,140]. Нарешті, зонд ICT2 показав зростання μ_e відносно значення для ThT, що також може свідчити про стабілізацію стану LE [150].

Таким чином, ICT2, ICT3 та ThT мають схожі фотофізичні властивості та флуоресцентні відповіді у присутності амілоїдних фібрил інсуліну та лізоциму. ICT3 має найбільш схожий із ThT профіль енергії збудження (рис. 5.5Б), нижчу стабільність стану LE зонда (таблиця 3.10, Q_0) та найбільшу чутливість до амілоїдних фібрил інсуліну, у порівнянні з іншими похідними ThT. Вища стабільність станів LE зондів ICT4 та ICT5 у буфері призводить до значного падіння їх чутливості до агрегатів білка, порівняно з ThT.

5.3. Висновки

1. За допомогою квантово-хімічних розрахунків у базисі B3LYP/DFT(TDDFT)/6-31G(d,p) або методом PM6, для бензантронових та сквараїнових зондів розраховано дескриптори просторової, електронної структури та молекулярні дескриптори у газовій фазі. Для групи бензантронів з високою чутливістю до амілоїдних фібрил лізоциму за допомогою QSAR аналізу отримано теоретичну модель для I/I_0 , що підкреслює роль гідрофобних, стеричних, ароматичних, ван-дер-Ваальсових та іон-дипольних взаємодій у підвищенні чутливості бензантронів до амілоїдних фібрил. Зокрема, потенційними амілоїдними маркерами є такі бензантрони, що мали

високі значення дескриптора ліпофільності, більшу ширину та вищу суму зарядів на атомах азоту.

2. Аналіз залежності квантово-хімічних дескрипторів, розрахованих у газовій фазі методом B3LYP/DFT(TDDFT)/6-31G(d,p), від торсійного кута між бензотіазольним та фенольним кільцями похідних тіофлавіну Т показав, що нижчі флуоресцентні відповіді ICT2, ICT3 у присутності фібрил лізоциму та інсуліну, ніж у ThT, зумовлені меншою стабільністю станів TICT цих зондів. Крім того, вища стабільність локально збуджених станів зондів ICT4 та ICT5 у буфері призводить до значного падіння їх чутливості до агрегатів білка відносно ThT.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі зроблено внесок у вирішення однієї з важливих проблем сучасної молекулярної біофізики – встановлення молекулярних механізмів взаємодії флуоресцентних зондів різних класів з амілоїдними фібрилами. З використанням різних модифікацій методу флуоресцентної спектроскопії проведено комплексне дослідження взаємодії нових зондів з амілоїдними фібрилами, утвореними *in vitro*. Отримані дані дають основу для розуміння механізмів дії потенційних лікувальних засобів проти «конформаційних» захворювань.

1. За допомогою методу флуоресцентної спектроскопії вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових бензантронових, сквараїнових зондів та похідних тіофлавіну Т з фібрилами лізоциму та інсуліну. В рамках мономодальної моделі зв'язування проведено оцінку термодинамічних параметрів процесу асоціації цих флуорофорів з білковими агрегатами.
2. Продемонстровано залежність чутливості нових флуоресцентних сполук до амілоїдних фібрил від типу білка, зовнішніх умов формування білкових агрегатів, та від фізико-хімічних параметрів оточення.
3. Встановлено, що серед 39 флуорофорів, які були протестовані в даній роботі, найбільш перспективними амілоїдними маркерами є сквараїни G6, G7, та бензантрони ІАН, АВМ, АМ4, ІВН, АМ12, А4, 3АМ39, АМ15, АМ2-23, АМ18-23. Також G6, G7 виявляють вищу специфічність до амілоїдних фібрил лізоциму, ніж тіофлавін Т. Експериментально доведено, що чутливість сквараїнів G6, G7 до в'язкості, а бензантронів до полярності мікрооточення зумовлює їх здатність до детектування змін цих параметрів амілоїдних фібрил.
4. Аналіз зв'язування бензантронів та цвіттеріонного сквараїну G6 з фібрилами лізоциму та інсуліну при варіюванні рН та іонної сили середовища дозволив визначити, що оптимальними умовами детектування білкових агрегатів є значення рН 7,4 та іонної сили менше

- 0,15 М. При цьому нові зонди були здатні детектувати зміни морфології фібрил, викликані локальними змінами рН та іонної сили.
5. Аналіз графіків Скетчарда виявив для більшості нових зондів наявність лише одного типу сайтів зв'язування – жолобків вздовж головної осі амілоїдної фібрили, хоча 9 барвників мали ще й неспецифічні сайти. Руйнування жолобків лікувальними засобами може призвести до зниження квантового виходу флуорофорів.
 6. При вивченні індуктивно-резонансного переносу енергії між тіофлавіном Т та досліджуваними флуорофорами зроблено припущення про локалізацію бензантронових зондів у збагачених ароматичними амінокислотами жолобках фібрил інсуліну, лізоциму та фрагменту 1-83 аполіпопротеїну А-I.
 7. На основі квантово-хімічних розрахунків та QSAR аналізу виявлено позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил найкращих амілоїдних маркерів бензантронового ряду та такими дескрипторами, як ліпофільність, ширина молекули зонда та сума зарядів на атомах азоту. Внесок дескрипторів ліпофільності та ширини молекули узгоджується з експериментальними даними про те, що висока специфічність зондів до фібрил зумовлена їх чутливістю до полярності оточення та стеричними ефектами.
 8. Аналіз залежностей квантово-хімічних дескрипторів похідних тіофлавіну Т від торсійного кута між донорними та акцепторними частинами молекул показав, що менша чутливість цих зондів до фібрил, ніж у тіофлавіну Т, та високі значення квантових виходів флуорофорів у буфері, зумовлені стабільністю локально збуджених станів сполук ICT4, ICT5, або меншою стабільністю станів закрученого внутрішньомолекулярного переносу заряду ICT2, ICT3, у порівнянні з тіофлавіном Т.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils // M. Groenning, M. Norrman, J.M. Flink, et al. / *Journal of Structural Biology*. – 2007. – Vol. 159. – P. 483 – 497.
2. Harper J.D. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease Amyloid- β protein // J.D. Harper, C.M. Lieber, P.T. Lansbury, Jr. / *Chemistry & Biology*. – 1997. – Vol. 4. – P. 951 – 959.
3. Hong H.S. Inhibition of Alzheimer's amyloid toxicity with a tricyclic pyrone molecule in vitro and in vivo // H.S. Hong, S. Rana, L. Barrigan, et al. / *Journal of Neurochemistry*. – 2009. – Vol. 108. – P. 1097 – 1108.
4. Yang F. Curcumin inhibits formation of Amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo // F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, et al. / *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – P. 5892 – 5901.
5. Wetzel R. Plasticity of amyloid fibrils // R. Wetzel, S. Shivaprasad, A.D. Williams / *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – P. 1 – 10.
6. Goda S. Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution // S. Goda, K. Takano, Y. Yamagata, et al. / *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. – 2000. – Vol. 9. – P. 369 – 375.
7. Muzaffar M. The mechanism of enhanced insulin amyloid fibril formation by NaCl is better explained by a conformational change model // M. Muzaffar, A. Ahmad / *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – e27906.
8. Gonta S. Fluorescent substituted amidines of benzanthrone: Synthesis, spectroscopy and quantum chemical calculations // S. Gonta, M. Utinans, G. Kirilov, et al. / *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. – Vol. 101. – P. 325 – 334.
9. Siddlingeshwar B. Photophysical characteristics of three novel benzanthrone derivatives: Experimental and theoretical estimation of dipole moments // B. Siddlingeshwar, S.M. Hanagodimath, E.M. Kirilova, G.K. Kirilov / *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. – 2011. – Vol. 112. – P. 448 – 456.

10. Kalnina I. Fluorescent probe abm and estimation of immune state in patients with different pathologies (review article) // I. Kalnina, R. Bruvere, T. Zvagule, et al. / Journal of Fluorescence. – 2010. – Vol. 20. – P. 9 – 17.
11. Patonay G. Noncovalent labeling of biomolecules with red and near- infrared dyes // G. Patonay, J. Salon, J. Sowell, L. Strekowski / Molecules. – 2004. – Vol. 9. – P. 40 – 42.
12. Vus K. Thioflavin T derivatives for the characterization of insulin and lysozyme amyloid fibrils in vitro: Fluorescence and quantum-chemical studies // K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, et al. / Journal of Luminescence. – 2015. – Vol. 159. – P. 284–293.
13. Vus K. Saito Association of novel benzanthrone dyes with amyloid fibrils: A resonance energy transfer study // K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, P. Kinnunen, E. Kirilova, G. Kirilov, A. Adachi, H. Saito / Вісник Львівського Університету. – 2014. – 68. – Т. 189 – С. 194.
14. Vus K.O. Novel squarylium dyes for detection of amyloid insulin and lysozyme in vitro // K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, R. Sood, P. Kinnunen / Біофізичний Вісник. – 2014. – Т. 32, № 2. – С. 61 – 68.
15. Vus K. Fluorescence investigation of interactions between novel benzanthrone dyes and lysozyme amyloid fibrils // K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, et al. / Journal of Fluorescence. – 2014. – Vol. 24. – P. 493–504.
16. Vus K. O. The role of metal ions in the fibrillization of lysozyme and insulin in vitro // K. O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E.I. Slobozhanina, L.M. Lukyanenko, R. Sood, P. Kinnunen / Біофізичний Вісник. – 2013. – Т. 30, №2. – С. 28 – 34.
17. Vus K., V. Trusova, G. Gorbenko, et al. Novel aminobenzanthrone dyes for amyloid fibril detection // K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, et al. / Chemical Physics Letters. – 2012. – Vol. 532. – P. 110 – 115.
18. Vus K.O. Interaction of novel benzanthrone derivative with amyloid lysozyme // K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, O.A. Zhytniakivska, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina / Біофізичний Вісник. – 2011. – Т. 26, №1. – С. 73 – 82.

19. Vus K.O. Quantitative analysis of the benzanthrone aminoderivative binding to amyloid fibrils of lysozyme // K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina / Біофізичний Вісник. – 2010. – Т. 25, №2. – С. 80 – 87.
20. Vus K.O., Affinity of new benzanthrone dyes for fibrillar and prefibrillar lysozyme / K.O. Vus, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна. – 5-8 квітня 2011. – Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. – С. 18 – 19.
21. Vus K.O. Development of new fluorescent probes for amyloid detection / K.O. Vus, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Proc. VIII European Biophysics Congress, Budapest, Hungary. – August 23-27, 2011. – European Biophysical Journal. –Vol. 40. – Suppl. 1. – S64.
22. Vus K.O. Characterization of the aminobenzanthrones' specificity to pre-fibrillar lysozyme / K.O. Vus, V.M. Trusova, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Abstr. of the VI International young scientists' conference «Biology: from a molecule up to the biosphere», Kharkiv, Ukraine. – November 22-25 2011. – Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University, 2011. – P. 39 – 40.
23. Vus K.O. Spectral properties of benzanthrone dyes in solvents with different viscosity / K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Тезиси 19 міжнародної школи-конференції «Математика. Комп'ютер. Образование», Дубна, Росія. – 30 январа-4 февраль 2012. – Москва: Изд. R&C Dynamics, 2012. – С. 12.
24. Vus K.O. Novel benzanthrone dyes for studying amyloid morphology / K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Матеріали VIII міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії БФФХ – 2012», Севастополь, Україна. – 23-27 квітня 2012. – Севастополь: Севастопольський національний технічний університет, 2012. – С. 121 – 122.
25. Vus K.O. Fluorimetric detection of lysozyme amyloid fibrils and their membrane interactions / K.O. Vus, A.P. Kastorna, E.M. Kirilova, G.K. Kirilov, I. Kalnina //

Материалы IV съезда биофизиков России, Нижний Новгород, Россия. – 20-27 августа 2012. – Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, 2012. – С. 336.

26. Вус Е.А. Оценка амилоид-специфичности новых бензантроновых зондов / Е.А. Вус, В.М. Трусова, Г.П. Горбенко, Е. Кирилова, Г. Кирилов, И. Калниня // Сборник тезисов XVI международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, Россия. – 16-21 апреля 2012. – С. 99 – 100.

27. Вус Е.А. Влияние ионной силы на связывание аминобензантроновых зондов с фибриллами лизоцима / Е.А. Вус, В.М. Трусова, Г.П. Горбенко, Е. Кирилова, Г. Кирилов, И. Калниня // Сборник тезисов IV всероссийской конференции «Актуальные проблемы химии и биологии», Пущино, Россия. – 30 июля-3 августа 2012. – С.16.

28. Vus K. Aminobenzanthrone dyes as prospective fluorophores for detection and characterization of amyloid fibrils / K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Abstr. of international conference «Development and application of new fluorescent materials and methods», Daugavpils, Latvia. – September 12 2012. – P. 33.

29. Vus K.O. Association of novel aminobenzanthrone dyes with fibrillar variants of apolipoprotein A-I probed by resonance energy transfer / K.O. Vus, M.S. Grych, E. Adachi, C. Mizuguchi, H. Saito, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov // Abstract book of X International Interdisciplinary Scientific Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska Vesna – 2013: Life Sciences», Kyiv, Ukraine. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 2013. – March 18-22 2013. – P. 12.

30. Vus K.O. Varying the environmental conditions is important for the formation of amyloid nanomaterials with designed properties / K.O. Vus, M.V. Romanova, I.L. Maliyov, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, R. Sood, P. Kinnunen, E.M. Kirilova, G.K. Kirilov // Materials of International research and practice conference

«Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2013)», Bukovel, Ukraine. – August 25 – September 1 2013. – P. 326.

31. Vus K. Probing amyloid fibrils of lysozyme with novel benzanthrone dyes / K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, I. Kalnina // Abstr. of 13-th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF-13), Genoa, Italy. – September 8-11 2013. – P. 251.

32. Vus K.O. Effect of metal ions on the kinetics of lysozyme amyloid formation / K.O. Vus, O.K. Kutsenko, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, P. Kinnunen // Materials of III-rd International conference of young scientists «Fundamental and applied research in biology», Donetsk, Ukraine. – February 24-27 2014. – Donetsk National University, 2014. – P. 300 – 301.

33. Vus K. Effect of oxidized and anionic phospholipids on the kinetics of insulin fibrillization / K. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, P.K.J. Kinnunen // Сборник тезисов IV международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2014», Пущино, Россия. – 27-29 октября 2014. – С. 99 – 100.

34. Vus K. Sensitivity of novel Thioflavin T derivatives to amyloid fibrils: Fluorescence and quantum-chemical studies / K. Vus, V. Trusova, G. Gorbenko, Rohit Sood, P. Kinnunen // Book of abstracts of 4-th International Scientific and Technical Conference for Yound Scientists «Luminescent Processes in Condensed State of Matter – LUMCOS – 2015», Kharkiv, Ukraine. – October 7-9 2015. – Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 2015. – P. 49 – 50.

35. Vus K.O. QSAR analysis of novel benzanthrone dyes for amyloid detection / K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, E. Kirilova, G. Kirilov, P. Kinnunen // Сборник тезисов международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2015», Пущино, Россия. – 2-3 ноября 2015. – С. 66 – 67.

36. Uversky V.N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded // V.N. Uversky, A.L. Fink / *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*. – 2004. – Vol. 1698. – P. 131 – 153.
37. Bauer H.H. Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin // H.H. Bauer, U. Aebi, M. Häner, et al. / *Journal of Structural Biology*. – 1995. – Vol. 115. – P. 1 – 15.
38. Hill S.E. Spatial extent of charge repulsion regulates assembly pathways for lysozyme amyloid fibrils // S.E. Hill, T. Miti, T. Rychmond, M. Muschol / *PloS ONE*. – 2001. – Vol. 6. – e18171.
39. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: New examples in medicine and biology of the dark side of the protein world // M. Stefani / *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*. – 2004. – Vol. 1739. – P. 5 – 25.
40. Oda T. Clusterin (apoJ) alters the aggregation of Amyloid β -peptide (A β 1-42) and forms slowly sedimenting A β complexes that cause oxidative stress // T. Oda, P. Wals, H.H. Osterburg, et al. / *Experimental Neurology*. – 1995. – Vol. 136. – P. 22 – 31.
41. Bucciantini M. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity // M. Bucciantini, G. Calloni, F. Chiti, et al. / *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 31374 – 31382.
42. Wang J.-B. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils // J.-B. Wang, Y.-M. Wang, C.-M. Zeng / *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – Vol. 415. – P. 675 – 679.
43. Cymes G.D. Detection and characterization of an ovine placental lactogen stable intermediate in the urea-induced unfolding process // G.D. Cymes, J.M. Delfino, C. Wolfenstein-Todel, C. Grosman / *Protein Science*. – 1996. – Vol. 5. – P. 2074 – 2079.
44. Ayed A. A stable intermediate in the equilibrium unfolding of escherichia coli citrate synthase // A. Ayed, H.W. Duckworth / *Protein Science*. – 1999. – Vol. 8. – P. 1116 – 1126.

45. Fowler D.M. Functional amyloid formation within mammalian tissue // D.M. Fowler, A.V. Koulov, C. Alory-Jost, et al. / PLoS Biology. – 2006. – Vol. 4. – e6.
46. Hammer N.D. The curli nucleator protein, csgB, contains an amyloidogenic domain that directs csgA polymerization // N.D. Hammer, J.C. Schmidt, M.R. Chapman / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2007. – Vol. 104. – P. 12494 – 12499.
47. Dobson C.M. Protein misfolding, evolution and disease // C.M. Dobson / Trends in Biochemical Sciences. – 1999. – Vol. 24. – P. 329 – 332.
48. Dobson C.M. The structural basis of protein folding and its links with human disease // C.M. Dobson / Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. – 2001. – Vol. 356. – P. 133 – 145.
49. Di Michele L. Minimal model for self-catalysis in the formation of amyloid-like elongated fibrils // L. Di Michele, E. Eiser, V. Foderà / The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 4. – P. 3158 – 3164.
50. Gsponer J. Theoretical approaches to protein aggregation // J. Gsponer, J.G. Vendruscolo / Protein & Peptide Letters – 2006. – Vol. 13. – P. 7.
51. Serpell L.C. Alzheimer's amyloid fibrils: Structure and assembly // L.C. Serpell / Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease. – 2000. – Vol. 1502. – P. 16 – 30.
52. Adamcik J. Proteins fibrils from a polymer physics perspective // J. Adamcik, R. Mezzenga / Macromolecules. – 2012. – Vol. 45. – P. 1137 – 1150.
53. Adamcik J. Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils // J. Adamcik, R. Mezzenga / Soft Matter. – 2011. – Vol. 7. – P. 5437 – 5443.
54. Tycko R. Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils // R. Tycko / Current Opinion in Structural Biology. – 2004. – Vol. 14. – P. 96 – 103.
55. Galzitskaya O.V. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains // O.V. Galzitskaya, S.O. Garbuzynskiy, M.Y. Lobanov / PLoS Computational Biology. – 2006. – Vol. 2. – e177.

56. Tartaglia G.G. The Zygggregator method for predicting protein aggregation propensities // G.G. Tartaglia, M. Vendurscolo / Chemical Social Review. – 2008. – Vol. 37. – P. 1395 – 1401.
57. Pawar A.P. Prediction of “aggregation-prone” and “aggregation-susceptible” regions in proteins associated with neurodegenerative diseases // A.P. Pawar, K.F. DuBay, J. Zurdo, et al. / Journal of Molecular Biology. – 2005. – Vol. 350. – P. 379 – 392.
58. Segrest J.P. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: A review of secondary structure and function // J.P. Segrest, M.K. Jones, H. De Loof, et al. / Journal of Lipid Research. – 1992. – Vol. 33. – P. 141 – 166.
59. Frare E. A highly amyloidogenic region of hen lysozyme // E. Frare, P. P. de Laureto, J. Zurdo, et al. / Journal of Molecular Biology. – 2004. – Vol. 340. – P. 1153 – 1165.
60. Jahn T.R. The yin and yang of protein folding // T.R. Jahn, S.E. Radford / FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272. – P. 5962 – 5970.
61. Harper J.D. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins // J.D. Harper, P.T. Lansbury / Annual Review of Biochemistry. – 1997. – Vol. 66. – P. 385 – 407.
62. Gillam J.E. Modelling amyloid fibril formation kinetics: Mechanisms of nucleation and growth // J.E. Gillam, C.E. MacPhee / Journal of Physics: Condensed Matter. – 2013. – Vol. 25. – P. 373101.
63. Lomakin A. On the nucleation and growth of Amyloid beta-protein fibrils: Detection of nuclei and quantitation of rate constants // A. Lomakin, D.S. Chung, G.B. Benedek, et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1996. – 93. – 1125 – 1129.
64. Kashchiev D. Nucleation of amyloid fibrils // D. Kashchiev, S. Auer / The Journal of Chemical Physics. – 2010. – Vol. 132. – P. 215101 – 215121.
65. Kusumoto Y. Temperature dependence of Amyloid beta-protein fibrillization // Y. Kusumoto, A. Lomakin, D.B. Teplow, G.B. Benedek / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1998. – Vol. 95. – P. 12277 – 12282.

66. O'Nuallain B. Thermodynamics of A β (1–40) amyloid fibril elongation // B. O'Nuallain, S. Shivaprasad, I. Kheterpal, R. Wetzel / *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – P. 12709 – 12718.
67. Crespo R. A generic crystallization-like model that describes the kinetics of amyloid fibril formation // R. Crespo, F.A. Rocha, A.M. Damas, P.M. Martins / *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – P. 30585–30594.
68. Ferrão-Gonzales A.D. Controlling β -amyloid oligomerization by the use of naphthalene sulfonates: Trapping low molecular weight oligomeric species // A.D. Ferrão-Gonzales, B.K. Robbs, V.H. Moreau, et al. / *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – P. 34747 – 34754.
69. Mantyh P.W. Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of β -amyloid peptide // P.W. Mantyh, J.R. Ghilardi, S. Rogers, et al. / *Journal of neurochemistry*. – 1993. – Vol. 61. – P. 1171 – 1174.
70. Ohkuri T. Effect of the structure of the denatured state of lysozyme on the aggregation reaction at the early stages of folding from the reduced form // T. Ohkuri, S. Shioi, T. Imoto, T. Ueda / *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 347. – P. 159 – 168.
71. Sluzky V. Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces // V. Sluzky, J.A. Tamada, A.M. Klibanov, R. Langer / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1991. – Vol. 88. – P. 9377 – 9381.
72. Padrick S.B. Islet amyloid: Phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis† // S.B. Padrick, A.D. Miranker / *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – P. 4694 – 4703.
73. Patil S.M. Heterogeneous amylin fibril growth mechanisms imaged by total internal reflection fluorescence microscopy // S.M. Patil, A. Mehta, S. Jha, A.T. Alexandrescu / *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – P. 2808 – 2819.
74. Ruschak A.M. Fiber-dependent amyloid formation as catalysis of an existing reaction pathway // A.M. Ruschak, A.D. Miranker / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2007. – Vol. 104. – P. 12341 – 12346.

75. Martins P.M. Characterization of crystal growth using a spiral nucleation model // P.M. Martins, F. Rocha / Surface Science. – 2007. – 601. – 3400 – 3408.
76. Chatani E. Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of β 2-microglobulin with tryptophan mutagenesis // E. Chatani, R. Ohnishi, T. Konuma, et al. / Journal of Molecular Biology. – 2010. – Vol. 400. – P. 1057 – 1066.
77. Konuma T. Kinetic intermediates of β 2-microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling h/d exchange combined with nmr analysis // T. Konuma, E. Chatani, M. Yagi, et al. / Journal of Molecular Biology. – 2011. – 405. – 851 – 862.
78. Jarrett J.T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? // J.T. Jarrett, P.T. Lansbury, Jr. / Cell. – 1993. – Vol. 73. – P. 1055 – 1058.
79. Santoso A. Molecular basis of a yeast prion species barrier // A. Santoso, P. Chien, L.Z. Osherovich, J.S. Weissman / Cell. – 2000. – Vol. 100. – P. 277 – 288.
80. Sweers K.K.M. Nanomechanical properties of single amyloid fibrils // K.K.M. Sweers, M.L. Bennink, V. Subramaniam / Journal of Physics: Condensed Matter. – 2012. – Vol. 24. – P. 243101 – 243124.
81. Knowles T.P.J. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials // T.P.J. Knowles, M.J. Buehler / Nat. Nano. – 2011. – Vol. 6. – P. 469 – 479.
82. Solar M. Comparative analysis of nanomechanics of protein filaments under lateral loading // M. Solar, M.J. Buehler / Nanoscale. – 2012. – 4. – 1177–1183.
83. Relini A. Detection of populations of amyloid-like protofibrils with different physical properties // A. Relini, S. Torrassa, R. Ferrando, et al. / Biophys Journal. – 2010. – Vol. 98. – P. 1277 – 1284.
84. Adamcik J. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images // J. Adamcik, J.-M. Jung, J. Flakowski, et al. / Nat. Nano. – 2010. – Vol. 5. – P. 423 – 428.
85. Smith J.F. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils // J.F. Smith, T.P.J. Knowles, C.M. Dobson, et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2006. – Vol. 103. – P. 15806 – 15811.

86. Adamcik J. Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy // J. Adamcik, R. Mezzenga / *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. – 2012. – Vol. 17. – P. 369 – 376.
87. Mishra R. Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile Red // R. Mishra, D. Sjolander, P. Hammarstrom / *Molecular BioSystems*. – 2011. – Vol. 7. – P. 1232 – 1240.
88. Sweers K. Nanomechanical properties of α -synuclein amyloid fibrils: A comparative study by nanoindentation, harmonic force microscopy, and peak force QNM // K. Sweers, van der Werf Kees, M. Bennink, V. Subramaniam / *Nanoscale Research Letters*. – 2011. – Vol. 6. – P. 270 – 279.
89. Mostaert A.S. Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive // A.S. Mostaert, M.J. Higgins, T. Fukuma, et al. / *Journal of Biological Physics*. – 2006. – Vol. 32. – P. 393 – 401.
90. Mostaert A.S. Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae // A.S. Mostaert, Giordani, C., Crockett, R., Karsten, U., Schumann, R., and Jarvis, S. P. / *The Journal of Adhesion*. – 2009. – Vol. 85. – P. 465 – 473.
91. Mezzenga R. Effects of charge double layer and colloidal aggregation on the isotropic–nematic transition of protein fibers in water // R. Mezzenga, J.-M. Jung, J. Adamcik / *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26. – P. 10401 – 10405.
92. Lakowicz J. R. Principles of fluorescent spectroscopy / J. R. Lakowicz. – New York: Springer, 2006. – 960 p.
93. Fei X. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe // X. Fei, Y. Gu / *Progress in Natural Science*. – 2009. – Vol. 19. – P. 1–7.
94. Christie R.M. Fluorescent dyes // R.M. Christie / *Review of Progress in Coloration and Related Topics*. – 1993. – Vol. 23. – P. 1 – 18.
95. Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // M.R. Nilsson / *Methods*. – 2004. – Vol. 34. – P. 151 – 160.
96. Meijer J.T. Stabilization of peptide fibrils by hydrophobic interaction // J.T. Meijer, M. Roeters, V. Viola, et al. / *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – P. 2058 – 2063.

97. Biancalana M. Molecular mechanism of thioflavin-t binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies // M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide / *Journal of Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 385. – P. 1052 – 1063.
98. Morozova-Roche L.A. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants // L.A. Morozova-Roche, J. Zurdo, A. Spencer, et al. / *Journal of Structural Biology*. – 2000. – Vol. 130. – P. 339 – 351.
99. Koo B.W. Contribution of the intrinsic disulfide to the assembly mechanism of islet amyloid // B.W. Koo, A.D. Miranker / *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. – 2005. – Vol. 14. – P. 231 – 239.
100. Sulatskaya A.I. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils: Stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye // A.I. Sulatskaya, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov / *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2011. – Vol. 115. – P. 11519 – 11524.
101. Shahi P. Formation of amyloid fibrils via longitudinal growth of oligomers† // P. Shahi, R. Sharma, S. Sanger, et al. / *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – P. 7365 – 7373.
102. Wigenius J. Interactions between a luminescent conjugated oligoelectrolyte and insulin during early phases of amyloid formation // J. Wigenius, G. Persson, J. Widengren, O. Inganäs / *Macromolecular Bioscience*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1120 – 1127.
103. Klunk W.E. Imaging brain amyloid in alzheimer's disease with pittsburgh compound-b // W.E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, et al. / *Annals of Neurology*. – 2004. – Vol. 55. – P. 306 – 319.
104. Nesterov E.E. In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: Design of fluorescent markers // E.E. Nesterov, J. Skoch, B.T. Hyman, et al. / *Angewandte Chemie International Edition*. – 2005. – Vol. 44. – P. 5452 – 5456.
105. Raikar U.S. Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: Determination of ground and excited state dipole

- moment // U.S. Raikar, C.G. Renuka, Y.F. Nadaf, et al. / *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2006. – Vol. 65. – P. 673 – 677.
106. Hammud H. Solvent effect on the absorption and fluorescence emission spectra of some purine derivatives: Spectrofluorometric quantitative studies // H. Hammud, K. Bouhadir, M. Masoud, et al. / *Journal of Solution Chemistry*. – 2008. – Vol. 37. – P. 895 – 917.
107. Perochon E. Fluorescence properties of methyl 8-(2-anthroyl) octanoate, a solvatochromic lipophilic probe // E. Perochon, A. Lopez, J.F. Toccanne / *Chemistry and Physics of Lipids*. – 1991. – Vol. 59. – P. 17 – 28.
108. Rosenberg H.M. Solvent shifts in electronic spectra: i. Stokes shift in a series of homologous aromatic amines // H.M. Rosenberg, E. Eimutis / *Spectrochimica Acta*. – 1966. – Vol. 22. – P. 1751 – 1757.
109. Sumitani M. Temperature dependence of fluorescence lifetimes of trans-stilbene // M. Sumitani, N. Nakashima, K. Yoshihara, S. Nagakura / *Chemical Physics Letters*. – 1977. – Vol. 51. – P. 183 – 185.
110. Lapouyade R. Photophysics of donor-acceptor substituted stilbenes. A time-resolved fluorescence study using selectively bridged dimethylamino cyano model compounds // R. Lapouyade, K. Czeschka, W. Majenz, et al. / *The Journal of Physical Chemistry*. – 1992. – Vol. 96. – P. 9643 – 9650.
111. Momicchioli F. Concerning medium polarity effects on the photophysics and photochemistry of tict-forming dyes // F. Momicchioli, I. Baraldi, A. Carnevali, et al. / *Coordination Chemistry Reviews*. – 1993. – Vol. 125. – P. 301 – 315.
112. Haidekker M. Dyes with segmental mobility: Molecular rotors // In *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology* / Eds. A.P. Demchenko. – Springer. – 2010. – P. 267 – 308.
113. Grabowski Z.R. Twisted intramolecular charge transfer (tict) excited states: Energy and molecular structure // Z.R. Grabowski, J. Dobkowski / *Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – Vol. 55. – P. 245 – 252.

114. Biancalana M. Molecular mechanism of thioflavin-t binding to amyloid fibrils // M. Biancalana, S. Koide / *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1804. – P. 1405 – 1412.
115. Wu C. Binding of Congo Red to amyloid protofibrils of the alzheimer A β (9-40) peptide probed by molecular dynamics simulations // C. Wu, J. Scott, J.-E. Shea / *Biophysical Journal.* – 2012. – Vol. 103. – P. 550 – 557.
116. Klunk W.E. Quantitative evaluation of Congo Red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation // W.E. Klunk, J.W. Pettegrew, Abraham D.J. / *J Histochem. Cytochem.* – 1989. – Vol. 37. – P. 1273 – 1281.
117. Steensma D.P. “Congo” red // D.P. Steensma / *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* – 2001. – Vol. 125. – P. 250 – 252.
118. Klunk W.E. Quantifying Amyloid β -peptide (A β) aggregation using the Congo Red-A β (cr-A β) spectrophotometric assay // W.E. Klunk, R.F. Jacob, R.P. Mason / *Analytical Biochemistry.* – 1999. – Vol. 266. – P. 66 – 76.
119. Yamaki S. Spectroscopic studies of the intermolecular interactions of Congo Red and tinopal cbs with modified cellulose fibers // S. Yamaki, D.S. Barros, C.M. Garcia, et al. / *Langmuir.* – 2005. – Vol. 21. – P. 5414 – 5420.
120. Demaimay R. Structural aspects of Congo Red as an inhibitor of protease-resistant prion protein formation // R. Demaimay, J. Harper, H. Gordon, et al. / *Journal of Neurochemistry.* – 1998. – Vol. 71. – P. 2534 – 2541.
121. Inouye H. A β fibrillogenesis: Kinetic parameters for fibril formation from Congo Red binding // H. Inouye, Kirschner, Daniel A. / *Journal of Structural Biology* – 2000. – Vol. 130. – P. 123 – 129.
122. Benditt E.P. Congo Red dichroism with dispersed amyloid fibrils, an extrinsic cotton effect // E.P. Benditt, N. Eriksen, C. Berglund / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1970. – Vol. 66. – P. 1044 – 1051.
123. Turnell W.G. Binding of the dye Congo Red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences // W.G. Turnell, J.T. Finch / *Journal of Molecular Biology.* – 1992. – Vol. 227. – P. 1205 – 1223.

124. Wu C. Dual binding modes of Congo Red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations // C. Wu, Z. Wang, H. Lei, et al. / Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129. – P. 1225 – 1232.
125. Katritzky A.R. Correlation and prediction of the refractive indices of polymers by qspr // A.R. Katritzky, S. Sild, M. Karelson / Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 1998. – Vol. 38. – P. 1171 – 1176.
126. Carter D.B. A model for structure-dependent binding of Congo Red to alzheimer β -amyloid fibrils // D.B. Carter, K.C. Chou / Neurobiology of Aging. – 1998. – Vol. 19. – P. 37 – 40.
127. Sereikaite J. Congo Red interaction with α -proteins // J. Sereikaite, V. Bumelis / Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol. 53. – P. 87 – 92.
128. Khurana R. Is Congo Red an amyloid-specific dye? // R. Khurana, V.N. Uversky, L. Nielsen, A.L. Fink / Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276. – P. 22715 – 22721.
129. Stopa B. The use of supramolecular structures as protein ligands // Stopa B., A. Jagusiak, L. Konieczny, et al. / Journal of Molecular Modelling. – 2013. – Vol. 19. – P. 4731 – 4740.
130. Kim Y.S. Manning MC, Stevens FJ, Carpenter JF. Congo Red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation // J.S. Kim, T.V. Randolph, Manning MC, Stevens FJ, Carpenter JF. / The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – P.10842 – 10850.
131. Zhang Y.-Z. Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin // Y.-Z. Zhang, X. Xiang, P. Mei, et al. / Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – Vol. 72. – P. 907 – 914.
132. Yokoyama K. Spectroscopic and calorimetric studies of Congo Red dye-amyloid peptide complexes // K. Yokoyama, A.D. Fisher, A.R. Amori, D.R. Welchons, R.E. McKnight / Journal of Biophysical Chemistry. – 2010. – Vol. 1. – P. 153 – 163.

133. Linke R.P. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo Red fluorescence // R.P. Linke / *Virchows Archiv.* – 2000. – Vol. 436. – P. 439 – 448.
134. Skowronek M., I. Roterman, L. Konieczny, et al. The conformational characteristics of Congo Red, Evans Blue and Trypan Blue // Skowronek M., I. Roterman, L. Konieczny, et al. / *Computers & Chemistry.* – 2000. – Vol. 24. – P. 429 – 450.
135. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils – current status // Groenning M. / *Journal of Chemical Biology.* – 2010. – Vol. 3. – P. 1 – 18.
136. Elghetany M.T. Methods for staining amyloid in tissues: A review // M.T. Elghetany, A. Saleem / *Stain Technology.* – 1988. – Vol. 63. – P. 201 – 212.
137. Sulatskaya A.I. Fluorescence quantum yield of Thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils // A.I. Sulatskaya, A.A. Maskevich, I.M. Kuznetsova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov / *PloS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – e15385.
138. Stsiapura V.I. Thioflavin T as a molecular rotor: Fluorescent properties of Thioflavin T in solvents with different viscosity // V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, et al. / *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2008. – Vol. 112. – P. 15893 – 15902.
139. Singh P.K. Viscosity effect on the ultrafast bond twisting dynamics in an amyloid fibril sensor: Thioflavin-T // P.K. Singh, M. Kumbhakar, H. Pal, S. Nath / *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2010. – Vol. 114. – P. 5920 – 5927.
140. Stsiapura V.I. Computational study of Thioflavin T torsional relaxation in the excited state // V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, et al. / *The Journal of Physical Chemistry A.* – 2007. – Vol. 111. – P. 4829 – 4835.
141. Stsiapura V.I. Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of Thioflavin T in low-viscosity solvents // V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, S.A. Tikhomirov, O.V. Bugarov / *The Journal of Physical Chemistry A.* – 2010. – Vol. 114. – P. 8345 – 8350.

142. Marek P. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology† // P. Marek, A. Abedini, B. Song, et al. / *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – P. 3255 – 3261.
143. Qin L. Highly sensitive amyloid detection enabled by thioflavin t dimers // L. Qin, J. Vastl, J. Gao / *Molecular BioSystems*. – 2010. – Vol. 6. – P. 1791 – 1795.
144. Naiki H. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin t1 // H. Naiki, K. Higuchi, Hosokawa M, Takeda T. / *Analytical Biochemistry*. – 1989. – Vol. 177. – P. 244 – 249.
145. Lindgren M. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy // M. Lindgren, K. Sörgjerd, P. Hammarström / *Biophysical Journal*. – 2005. – Vol. 88. – P. 4200 – 4212.
146. Ribeiro M.G. Synthesis and in vitro evaluation of fluorinated styryl benzazoles as amyloid-probes // M.G. Ribeiro, H.V. Miranda, I.C. Santos, et al. / *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 19. – P. 7698 – 7710.
147. LeVine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution // H. LeVine / *Protein science: a publication of the Protein Society*. – 1993. – Vol. 2. – P. 404 – 410.
148. Celej M.S. Fluorescent N-arylaminoanthracene sulfonate probes for amyloid aggregation of alpha-synuclein // M.S. Celej, E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin / *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 94. – P. 4867 – 4879.
149. Sabaté R. Thioflavin T fluorescence anisotropy: An alternative technique for the study of amyloid aggregation // R. Sabaté, S.J. Saupe / *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 360. – P. 135 – 138.
150. Voropai E.S. Spectral properties of Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils // E.S. Voropai, M.P. Samtsov, K.N. Kaplevskii, et al. / *Journal of Applied Spectroscopy*. – 2003. – Vol. 70. – P. 868 – 874.

151. Kuznetsova I. A new trend in the experimental methodology for the analysis of the Thioflavin T binding to amyloid fibrils // I. Kuznetsova, A. Sulatskaya, V. Uversky, K. Turoverov / *Molecular Neurobiology*. – 2012. – Vol. 45. – P. 488 – 498.
152. Alí-Torres J. Insights on the binding of thioflavin derivative markers to amyloid-like fibril models from quantum chemical calculations // J. Alí-Torres, A. Rimola, C. Rodríguez-Rodríguez, et al. / *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117. – P. 6674 – 6680.
153. Harel M. Crystal structure of Thioflavin T bound to the peripheral site of torpedo californica acetylcholinesterase reveals how Thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site // M. Harel, L.K. Sonoda, I. Silman, et al. / *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – P. 7856 – 7861.
154. Kuznetsova I.M. Analyzing Thioflavin T binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique // I.M. Kuznetsova, A.I. Sulatskaya, V.N. Uversky, K.K. Turoverov / *PloS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – P. e30724.
155. Krebs M.R.H. The binding of Thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications // M.R.H. Krebs, E.H.C. Bromley, A.M. Donald / *Journal of structural biology*. – 2005. – Vol. 149. – P. 30 – 37.
156. Rodriguez-Rodriguez C. Crystal structure of Thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: Insights at the molecular level // C. Rodriguez-Rodriguez, A. Rimola, L. Rodriguez-Santiago, et al. / *Chemical Communications*. – 2010. – Vol. 46. – P. 1156 – 1158.
157. Wu C. Binding modes of Thioflavin-T to the single-layer β -sheet of the peptide self-assembly mimics // C. Wu, M. Biancalana, S. Koide, J.-E. Shea / *Journal of Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 394. – P. 627 – 633.
158. Groenning M., L. Olsen, M. van de Weert, et al. Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities // M. Groenning, L. Olsen, M. van de Weert, et al. / *Journal of Structural Biology*. – 2007. – Vol. 158. – P. 358 – 369.

159. Khurana R. Mechanism of Thioflavin T binding to amyloid fibrils // R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, et al. / Journal of Structural Biology. – 2005. – Vol. 151. – P. 229 – 238.
160. Levine I.H. Stopped-flow kinetics reveal multiple phases of Thioflavin T binding to Alzheimer $\beta(1-40)$ amyloid fibrils // I.H. Levine / Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1997. – Vol. 342. – P. 306 – 316.
161. D'Amico M. Thioflavin T promotes A $\beta(1-40)$ amyloid fibrils formation // M. D'Amico, M.G. Di Carlo, M. Groenning, et al. / The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2012. – Vol. 3. – P. 1596 – 1601.
162. Foderà V. Thioflavin T hydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection // V. Foderà, M. Groenning, V. Vetri, et al. / The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – Vol. 112. – P. 15174 – 15181.
163. Volkova K.D. Cyanine dye–protein interactions: Looking for fluorescent probes for amyloid structures // K.D. Volkova, V.B. Kovalska, A.O. Balanda, et al. / Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2007. – Vol. 70. – P. 727 – 733.
164. Hong M.C. Synthesis and evaluation of stilbene derivatives as a potential imaging agent of amyloid plaques // M.C. Hong, Y.K. Kim, J.Y. Choi, et al. / Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 18. – P. 7724 – 7730.
165. Ran C. Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits // C. Ran, X. Xu, S.B. Raymond, et al. / Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131. – P. 15257 – 15261.
166. Wu C. On the origin of the stronger binding of PIB over Thioflavin T to protofibrils of the Alzheimer amyloid- β peptide: A molecular dynamics study // C. Wu, M.T. Bowers, J.-E. Shea / Biophysical Journal. – 2011. – Vol. 100. – P. 1316 – 1324.
167. Wei J. Development of novel amyloid imaging agents based upon Thioflavin S // J. Wei, C. Wu, D. Lankin, A, et al. / Current Alzheimer Research. – 2005. – Vol. 2. – P. 109 – 114.

168. Klunk W.E. Uncharged Thioflavin-T derivatives bind to Amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain // W.E. Klunk, Y. Wang, G.-F. Huang, et al. / *Life Sciences*. – 2001. – Vol. 69. – P. 1471 – 1484.
169. Hintersteiner M. In vivo detection of amyloid-[beta] deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe // M. Hintersteiner, A. Enz, P. Frey, et al. / *Nature Biotechnology*. – 2005. – Vol. 23. – P. 577 – 583.
170. Kitts C.C. Michler's hydrol blue: A sensitive probe for amyloid fibril detection // C.C. Kitts, T. Beke-Somfai, B. Nordén / *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – P. 3451 – 3461.
171. Carlsson N. Spectroscopic characterization of coomassie blue and its binding to amyloid fibrils // N. Carlsson, C.C. Kitts, B. Åkerman / *Analytical Biochemistry*. – 2012. – Vol. 420. – P. 33 – 40.
172. Gao G.-Q. A new fluorescent probe for monitoring amyloid fibrillation with high sensitivity and reliability // G.-Q. Gao, A.-W. Xu / *RSC Advances*. – 2013. – Vol. 3. – P. 21092 – 21098.
173. Sweers K.K.M. Nanomechanical properties of single amyloid fibrils // K.K.M. Sweers, M.L. Bennink, V. Subramaniam / *Journal of Physics: Condensed Matter*. – 2012. – Vol. 24. – P. 243101 - 243124.
174. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly // S. Zhang / *Nature Biotechnology*. – 2003. – Vol. 21. – P. 1171 – 1178.
175. Reches M. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes // M. Reches, E. Gazit / *Science*. – 2003. – Vol. 300. – P. 625 – 627.
176. Scheibel T. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition // T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, S.L. Lindquist / *Current Issue*. – 2003. – Vol. 100. – P. 4527 - 4532.
177. Carny O. Fabrication of coaxial metal nanocables using a self-assembled peptide nanotube scaffold // O. Carny, D.E. Shalev, E. Gazit / *Nano Letters*. – 2006. – Vol. 6. – P. 1594 – 1597.

178. Lu W. Nanoelectronics from the bottom up // W. Lu, C.M. Lieber / *Nature Materials*. – 2007. – Vol. 6. – P. 841 – 850.
179. Reches M. Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes // M. Reches, E. Gazit / *Nature Nanotechnology*. – 2006. – Vol. 1. – P. 195 – 200.
180. Maji S.K. Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs // S.K. Maji, D. Schubert, C. Rivier, et al. / *PLoS Biology*. – 2008. – Vol. 6. – e17.
181. Holmes T.C. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds // T.C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, et al. / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2000. – Vol. 97. – P. 6728 – 6733.
182. Gras S.L. Functionalised amyloid fibrils for roles in cell adhesion // S.L. Gras, A.K. Tickler, A.M. Squires, G.L. Devlin, M.A. Horton, C.M. Dobson, C.E. MacPhee / *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – P. 1553 – 1562.
183. Graveland-Bikker J.F. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet // J.F. Graveland-Bikker, C.G. de Kruif / *Trends in Food Science & Technology*. – 2006. – Vol. 17. – P. 196 – 203.
184. Yemini M. Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme–biosensor applications // M. Yemini, M. Reches, E. Gazit, J. Rishpon / *Analytical Chemistry*. – 2005. – Vol. 77. – P. 5155 – 5159.
185. Baldwin A.J. Cytochrome display on amyloid fibrils // A.J. Baldwin, R. Bader, J. Christodoulou, et al. / *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128. – P. 2162 – 2163.
186. Del Mercato L.L. Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils // L.L. Del Mercato, P.P. Pompa, G. Maruccio, et al. / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2007. – Vol. 104. – P. 18019 – 18024.
187. Meier C. Wet-spinning of amyloid protein nanofibers into multifunctional high-performance biofibers // C. Meier, M.E. Welland / *Biomacromolecules*. – 2011. – Vol. 12. – P. 3453 – 3459.
188. Scheibel T. Protein fibers as performance proteins: New technologies and applications // T. Scheibel / *Current Opinion in Biotechnology*. – 2005. – Vol. 16. – P. 427 – 433.

189. Hamed M. Electrochemical devices made from conducting nanowire networks self-assembled from amyloid fibrils and alkoxysulfonate pedot // M. Hamed, A. Herland, R.H. Karlsson, O. Inganäs / Nano Letters. – 2008. – Vol. 8. – P. 1736 – 1740.
190. Knowles T.P.J. Nanostructured films from hierarchical self-assembly of amyloidogenic proteins // T.P.J. Knowles, T.W. Oppenheim, A.K. Buell, et al. / Nature Nanotechnology. – 2010. – Vol. 5. – P. 204 – 207.
191. Adachi E. Dual role of an N-terminal amyloidogenic mutation in apolipoprotein A-i: Destabilization of helix bundle and enhancement of fibril formation // E. Adachi, H. Nakajima, C. Mizuguchi, et al. / The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – P. 2848 – 2856.
192. Kirilova E. Spectroscopic study of benzanthrone 3-N-derivatives as new hydrophobic fluorescent probes for biomolecules // E. Kirilova, I. Kalnina, G. Kirilov, I. Meirovics / Journal of Fluorescence. – 2008. – Vol. 18. – P. 645 – 648.
193. Sasahara K. Heat-induced conversion of β 2-microglobulin and hen egg-white lysozyme into amyloid fibrils // K. Sasahara, H. Yagi, H. Naiki, Y. Goto / Journal of Molecular Biology. – 2007. – Vol. 372. – P. 981 – 991.
194. Arnaudov L.N. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme // L.N. Arnaudov, R. de Vries / Biophys J. – 2005. – Vol. 88. – P. 515 – 526.
195. Holley M. Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution // M. Holley, C. Eginton, D. Schaefer, L.R. Brown / Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – Vol. 373. – P. 164 – 168.
196. Jiménez J.L. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils // J.L. Jiménez, E.J. Nettleton, M. Bouchard, et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – Vol. 99. – P. 9196 – 9201.
197. Nielsen L. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism† // L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, et al. / Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 6036 – 6046.

198. Kachooei E. Oligomeric forms of insulin amyloid aggregation disrupt outgrowth and complexity of neuron-like PC12 cells // E. Kachooei, A.A. Moosavi-Movahedi, F. Khodagholi, et al. / PloS ONE. – 2012. – Vol. 7. – e41344.
199. Girych M. Interaction of Thioflavin T with amyloid fibrils of Apolipoprotein A-i N-terminal fragment: Resonance energy transfer study // Girych M., G. Gorbenko, V. Trusova, et al. / Journal of Structural Biology. – 2014. – Vol. 185. – P. 116 – 124.
200. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
201. Yang H. DNA binding studies of a solvatochromic fluorescent probe 3-methoxy benzanthrone // H. Yang, W.-H. Liu, et al / Spectrochimical Acta. – 1999. – Vol. 55. – P. 2719 – 2727.
202. Ambrose R.J. Organic luminescent materials // R.J. Ambrose / Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters. – 1989. – Vol. 27. – P. 466 – 466.
203. Carlini F.M. New daylight fluorescent pigments // F.M. Carlini, C. Paffoni, G. Boffa / Dyes and Pigments. – 1982. – Vol. 3. – P. 59 – 69.
204. Kalnina I. Structural changes in lymphocytes membrane of chernobyl clean-up workers from Latvia // I. Kalnina, T. Zvagule, N. Gabruseva, et al. / Journal of Fluorescence. – 2007. – Vol. 17. – P. 633 – 638.
205. Kalnina I. Altered plasma albumin characteristics and lymphocyte populations in gastrointestinal cancer patients: Detection using modified fluorescence responses // I. Kalnina, E. Kirilova, L. Klimkane, G. Kirilov / Journal of Immunotoxicology. – 2009. – Vol. 6. – P. 293 – 300.
206. Thomas J. Synthesis and biosensor performance of a near-IR thiol-reactive fluorophore based on benzothiazolium squaraine // J. Thomas, D.B. Sherman, T.J. Amiss, et al. / Bioconjugate Chemistry. – 2007. – Vol. 18. – P. 1841 – 1846.
207. Oushiki D. Near-infrared fluorescence probes for enzymes based on binding affinity modulation of squarylium dye scaffold // D. Oushiki, H. Kojima, Y. Takahashi, et al. / Analytical Chemistry. – 2012. – Vol. 84. – P. 4404 – 4410.

208. Volkova K.D. Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes // K.D. Volkova, V.B. Kovalska, A.L. Tatarets, et al. / *Dyes and Pigments*. – 2007. – Vol. 72. – P. 285 – 292.
209. Ioffe V. Tracing lysozyme-lipid interactions with long-wavelength squaraine dyes // V. Ioffe, G. Gorbenko, P.K.J. Kinnunen, et al. / *Journal of Fluorescence*. – 2007. – Vol. 17. – P. 65 – 72.
210. Tam A.C. Optoacoustic determination of photocarrier generation efficiencies of dye films // A.C. Tam / *Applied Physics Letters*. – 1980. – Vol. 37. – P. 978 – 981.
211. Merritt V.Y. Organic solar cells of hydroxy squarylium // V.Y. Merritt, H.J. Hovel / *Applied Physics Letters*. – 1976. – Vol. 29. – P. 414 – 415.
212. Gayathri D.D. Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine: A novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer models in vivo // D.D. Gayathri, T.R. Cibilin, D. Ramaiah, A. Abraham / *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2008. – Vol. 92. – P. 153 – 159.
213. Santos P.F. Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes // P.F. Santos, L.V. Reis, P. Almeida, et al. / *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2003. – Vol. 160. – P. 159 – 161.
214. Ioffe V.M. Fluorescence study of protein–lipid complexes with a new symmetric squarylium probe // V.M. Ioffe, G.P. Gorbenko, T. Deligeorgiev, et al. / *Biophysical Chemistry*. – 2007. – Vol. 128. – P. 75 – 86.
215. Ioffe V. Examining protein-lipid interactions in model systems with a new squarylium fluorescent dye // V. Ioffe, G. Gorbenko, A. Tatarets, et al. / *Journal of Fluorescence*. – 2006. – Vol. 16. – P. 547 – 554.
216. Volkova K.D. Aza-substituted squaraines for the fluorescent detection of albumins // K.D. Volkova, V.B. Kovalska, M.Y. Losytskyy, et al. / *Dyes and Pigments*. – 2011. – Vol. 90. – P. 41 – 47.
217. Kovalska V.B. Fluorescent detection of a partially unfolded conformation of beta-lactoglobulin using squaraine dyes // V.B. Kovalska, M.Y. Losytskyy, L.V. Reis, et al. / *Macromolecular Symposia*. – 2014. – Vol. 335. – P. 43 – 50.

218. Arunkumar E. Squaraine-derived rotaxanes: Sterically protected fluorescent near-IR dyes // E. Arunkumar, C.C. Forbes, B.C. Noll, B.D. Smith / *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127. – P. 3288 – 3289.
219. Tatarets A.L. Synthesis of water-soluble, ring-substituted squaraine dyes and their evaluation as fluorescent probes and labels // A.L. Tatarets, I.A. Fedyunyayeva, T.S. Dyubko, et al. / *Analytica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 570. – P. 214 – 223.
220. Das S. Photochemistry of squaraine dyes. 8. Photophysical properties of crown ether squaraine fluoroionophores and their metal ion complexes // S. Das, K.G. Thomas, K.J. Thomas, et al. / *The Journal of Physical Chemistry*. – 1994. – Vol. 98. – P. 9291 – 9296.
221. Hawe A. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization // A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot / *Pharmaceutical Research*. – 2008. – Vol. 25. – P. 1487 – 1499.
222. Bolder S.G. Thioflavin T and birefringence assays to determine the conversion of proteins into fibrils // S.G. Bolder, L.M.C. Sagis, P. Venema, E. van der Linden / *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – P. 4144 – 4147.
223. Wu C. Amyloid imaging: From benchtop to bedside // C. Wu, V.W. Pike, Y. Wang / *Current Topics in Developmental Biology*. – 2005. – Vol. 70. – P. 171 – 213.
224. Mathis C.A. A lipophilic thioflavin-t derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain // C.A. Mathis, B.J. Bacskai, S.T. Kajdasz, et al. / *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2002. – Vol. 12. – P. 295 – 298.
225. Leuma Y.R. Thioflavin derivatives as markers for amyloid- β fibrils: Insights into structural features important for high-affinity binding // Y.R. Leuma, S. Mazères, P. Faller, E. Gras / *ChemMedChem*. – 2008. – Vol. 3. – P. 63 – 66.
226. Cisek K. QSAR studies for prediction of cross- β sheet aggregate binding affinity and selectivity // K. Cisek, J. Kuret / *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – P. 1434 – 1441.

227. Cohen A.D. Using Pittsburgh Compound B for in vivo pet imaging of fibrillar Amyloid-beta // A.D. Cohen, G.D. Rabinovici, C.A. Mathis, et al. / *Advances in Pharmacology* (San Diego, Calif.). – 2012. – Vol. 64. – P. 27 – 81.
228. Krebs M.R.H. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β -domain 1 // M.R.H. Krebs, D.K. Wilkins, E.W. Chung, et al. / *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 300. – P. 541 – 549.
229. Greenfield N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure // Greenfield N.J. / *Nature protocols*. – 2006. – Vol. 1. – P. 2876 – 2890.
230. Wang S.-S. Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants // S.-S. Wang, K.-N. Liu, T.-C. Han / *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. – 2010. – Vol. 1802. – P. 519 – 530.
231. Cao A. Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme // A. Cao, D. Hu, L. Lai / *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. – 2004. – Vol. 13. – P. 319 – 324.
232. Murali J., R. Jayakumar. Spectroscopic studies on native and protofibrillar insulin // Murali J., R. Jayakumar / *Journal of Structural Biology*. – 2005. – Vol. 150. – P. 180 – 189.
233. Holzwarth G. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides // Holzwarth G., P. Doty / *Journal of the American Chemical Society*. – 1965. – Vol. 87. – P. 218 – 228.
234. Kutsenko O. Rhodamine 101 as a fluorescent probe for sensing haemoglobin conformational changes at the lipid-water interface // O. Kutsenko, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko / *Journal of Biological Physics and Chemistry*. – 2008. – Vol. 8. – P. 43 – 48.
235. Dobrovolskaya E.V. Spectral behavior of amyloid – specific dyes in protein – lipid systems. I. Congo Red binding to model lipid membranes // E.V. Dobrovolskaya, A. Yudintsev, O.K. Zakharenko, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko / *Біофізичний Вісник*. – 2007. – Т. 19, №2. – С. 76 – 79.

236. Latypov R.F. Structural and thermodynamic effects of ANS binding to human interleukin-1 receptor antagonist // R.F. Latypov, D. Liu, K. Gunasekaran, et al. / Protein Science : A Publication of the Protein Society. – 2008. – Vol. 17. – P. 652 – 663.
237. Castro G. Emulsan quantitation by Nile Red quenching fluorescence assay // G. Castro, B. Larson, B. Panilaitis, D. Kaplan / Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. – Vol. 67. – P. 767 – 770.
237. Sasahara K. Partially unfolded equilibrium state of hen lysozyme studied by circular dichroism spectroscopy // K. Sasahara, M. Demura, K. Nitta / Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – P. 6475 – 6482.
239. Law K.Y. Squaraine chemistry: Effects of structural changes on the absorption and multiple fluorescence emission of bis[4-(dimethylamino)phenyl]squaraine and its derivatives // K.Y. Law / The Journal of Physical Chemistry. – 1987. – Vol. 91. – P. 5184 – 5193.
240. Volkova K.D. Specific fluorescent detection of fibrillar α -synuclein using mono- and trimethine cyanine dyes // K.D. Volkova, V.B. Kovalska, A.O. Balanda, et al. / Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 16. – P. 1452 – 1459.
241. Bujalowski W. Macromolecular competition titration method: Accessing thermodynamics of the unmodified macromolecule–ligand interactions through spectroscopic titrations of fluorescent analogs // W. Bujalowski, M.J. Jezewska / Methods in enzymology. – 2011. – Vol. 488. – P. 17 – 57.
242. Bordbar A.K. The shapes of scatchard plots for systems with two sets of binding sites // A.K. Bordbar, A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi / Biochemical Education. – 1996. – Vol. 24. – P. 172 – 175.
243. Rurack K. Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm // K. Rurack, M. Spieles / Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 83. – P. 1232 – 1242.
244. Dienes A. Comparative gain measurements for twelve organic laser dye solutions // Dienes A. / Journal of Applied Physics. – 1975. – Vol. 7. – P. 135 – 139.

245. Chattopadhyay A. Depth-dependent solvent relaxation in membranes: Wavelength-selective fluorescence as a membrane dipstick // A. Chattopadhyay, S. Mukherjee / *Langmuir*. – 1999. – Vol. 15. – P. 2142 – 2148.
246. Deng W. Detecting the inter-peptide arrangement and maturation process of transthyretin (105–115) amyloid fibril using a fret pair with short förster distance // W. Deng, A. Cao, L. Lai / *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 362. – P. 689 – 694.
247. Jackson H. Fibrillogenesis of alzheimer A β peptides studied by fluorescence energy transfer // H. Jackson, T.H. Fraser, P.E. Chakrabartty / *Journal of Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 269. – P. 214 – 224.
248. Dale R.E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer // R.E. Dale, J. Eisinger, W.E. Blumberg / *Biophysical Journal*. – 1979. – Vol. 26. – P. 161 – 193.
249. Besler B.H. Atomic charges derived from semiempirical methods // B.H. Besler, K.M. Merz, P.A. Kollman / *Journal of Computational Chemistry*. – 1990. – Vol. 11. – P. 431 – 439.
250. Bachs M. Optimization of solute cavities and van der Waals parameters in ab initio MST-SCRF calculations of neutral molecules // M. Bachs, F.J. Luque, M. Orozco / *Journal of Computational Chemistry*. – 1994. – Vol. 15. – P. 446 – 454.
251. Palm K. Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: Comparison with other computational and experimental predictors // K. Palm, K. Luthman, A.-L. Ungell, et al. / *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1998. – Vol. 41. – P. 5382 – 5392.
252. Hirst J.D. Nonlinear quantitative structure–activity relationship for the inhibition of dihydrofolate reductase by pyrimidines // J.D. Hirst / *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1996. – Vol. 39. – P. 3526 – 3532.
253. Rozas I. Molecular lipophilic potential on van der waals surfaces as a tool in the study of 4-alkylpyrazoles // I. Rozas, M. Martín / *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 1996. – Vol. 36. – P. 872 – 878.

254. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods v: Modification of nndo approximations and application to 70 elements // J.J.P. Stewart / Journal of Molecular Modelling. – 2007. – Vol. 13. – P. 1173 – 1213.
255. Schmidt M.W. General atomic and molecular electronic structure system // M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, et al. / Journal of Computational Chemistry. – 1993. – Vol. 14. – P. 1347 – 1363.
256. Binkley J.S. Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements // J.S. Binkley, J.A. Pople, W.J. Hehre / Journal of the American Chemical Society. – 1980. – Vol. 102. – P. 939 – 947.
257. Scheiner S. Theoretical studies of excited state proton transfer in small model systems // S. Scheiner / The Journal of Physical Chemistry A. – 2000. – Vol. 104. – P. 5898 – 5909.
258. Runge E. Density-functional theory for time-dependent systems // E. Runge, E.K.U. Gross / Physical Review Letters. – 1984. – Vol. 52. – P. 997 – 1000.
259. Dewar M.J.S. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model // M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart / Journal of The American Chemical Society. – 1985. – Vol. 107. – P. 3902 – 3909.
260. Foresman J.B. Toward a systematic molecular orbital theory for excited states // J.B. Foresman, M. Head-Gordon, J.A. Pople, M.J. Frisch / The Journal of Physical Chemistry. – 1992. – Vol. 96. – P. 135 – 149.
261. Stanton J.F. A comparison of single reference methods for characterizing stationary points of excited state potential energy surfaces // J.F. Stanton, J. Gauss, N. Ishikawa, M. Head-Gordon / The Journal of Chemical Physics. – 1995. – Vol. 103. – P. 4160 – 4174.
262. Cave R.J. Theoretical investigation of the ground and excited states of coumarin 151 and coumarin 120 // R.J. Cave, K. Burke, E.W. Castner / The Journal of Physical Chemistry A. – 2002. – Vol. 106. – P. 9294 – 9305.

263. Deglmann P. An efficient implementation of second analytical derivatives for density functional methods // P. Deglmann, F. Furche, R. Ahlrichs / *Chemical Physics Letters*. – 2002. – Vol. 362. – P. 511 – 518.
264. Zhytniakivska O.A. On the possibility of theoretical prediction of benzanthrone dye lipophilicity // O.A. Zhytniakivska / *Біофізичний Вісник*. – 2013. – Т. 30, №2. – С. 15 – 22.
265. Aso Y. Systematic analysis of aggregates from 38 kinds of non disease-related proteins: Identifying the intrinsic propensity of polypeptides to form amyloid fibrils // Y. Aso, K. Shiraki, M. Takagi / *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 71. – P. 1313 – 1321.
266. Kirilova E. Fluorescent study of human blood plasma albumin alterations induced by ionizing radiation // E. Kirilova, I. Kalnina, T. Zvagule, et al. / *Journal of Fluorescence*. – 2011. – Vol. 21. – P. 923 – 927.
267. Amini R. Apigenin reduces human insulin fibrillation in vitro and protects SK-N-MC cells against insulin amyloids // R. Amini, R. Yazdanparast, S. Bahramikia / *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – Vol. 60. – P. 334 – 340.
268. Shcharbin D. Dendrimer interactions with hydrophobic fluorescent probes and human serum albumin // D. Shcharbin, B. Klajnert, V. Mazhul, M. Bryszewska / *Journal of Fluorescence*. – 2005. – Vol. 15. – P. 21 – 28.
269. Bolognin S. Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid- $\alpha\beta$ 1–42 aggregation and toxicity // S. Bolognin, L. Messori, D. Drago, et al. / *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2011. – Vol. 43. – P. 877 – 885.
270. Knowles T.P. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils // T.P. Knowles, A.W. Fitzpatrick, S. Meehan, et al. / *Science*. – 2007. – Vol. 318. – P. 1900 – 1903.
271. Adamcik J. Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy // J. Adamcik, A. Berquand, R. Mezzenga / *Applied Physics Letters*. – 2011. – Vol. 98. – 193701.

272. Hu Y. A peptide probe for detection of various beta-amyloid oligomers // Y. Hu, B. Su, H. Zheng, J.R. Kim / *Molecular BioSystems*. – 2012. – Vol. 8. – P. 2741 – 2752.
273. Volkova K. Studies of benzothiazole and benzoselenazole squaraines as fluorescent probes for albumins detection // K. Volkova, V. Kovalska, M. Losytskyy, et al. / *Journal of Fluorescence*. – 2008. – Vol. 18. – P. 877 – 882.
274. Marshall T. Total protein determination in urine: Elimination of a differential response between the Coomassie Blue and Pyrogallol Red protein dye-binding assays // T. Marshall, K.M. Williams / *Clinical Chemistry*. – 2000. – Vol. 46. – P. 392 – 398.
275. Wang S.S.S. Amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme is inhibited by tcep // S.S.S. Wang, K.-N. Liu, Y.-C. Lu / *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 381. – P. 639 – 642.
276. Sasahara K. Amyloid nucleation triggered by agitation of β 2-microglobulin under acidic and neutral pH conditions // K. Sasahara, H. Yagi, M. Sakai, et al. / *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – P. 2650 – 2660.
277. Morel B. Environmental conditions affect the kinetics of nucleation of amyloid fibrils and determine their morphology // B. Morel, L. Varela, A.I. Azuaga, F. Conejero-Lara / *Biophys J*. – 2010. – Vol. 99. – P. 3801 – 3810.
278. Malisauskas M. Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? // M. Malisauskas, J. Ostman, A. Darinskas, et al. / *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – P. 6269 – 6275.
279. Yonezawa Y. An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small-angle x-ray and neutron scattering study // Y. Yonezawa, S. Tanaka, T. Kubota, et al. / *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 323. – P. 237 – 251.
280. Tanaka S. Denaturation and aggregation of hen egg lysozyme in aqueous ethanol solution studied by dynamic light scattering // S. Tanaka, Y. Oda, M. Ataka, et al. / *Biopolymers*. – 2001. – Vol. 59. – P. 370 – 379.

281. Lehmann M.S. Study of ethanol-lysozyme interactions using neutron diffraction // M.S. Lehmann, S.A. Mason, G.J. McIntyre / *Biochemistry*. – 1985. – Vol. 24. – P. 5862 – 5869.
282. Liu W. Amyloid fibril formation by peptide lys (11-36) in aqueous trifluoroethanol // W. Liu, J.M. Prausnitz, H.W. Blanch / *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5. – P. 1818 – 1823.
283. Morozova-Roche L.A. Equine lysozyme: The molecular basis of folding, self-assembly and innate amyloid toxicity // L.A. Morozova-Roche / *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581. – P. 2587 – 2592.
284. Zurdo J. Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an sh3 domain1 // J. Zurdo, J.I. Guijarro, J.L. Jiménez, et al. / *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 311. – P. 325 – 340.
285. Kuehner D.E. Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions // D.E. Kuehner, J. Engmann, F. Fergg, et al. / *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1999. – Vol. 103. – P. 1368 – 1374.
285. Tani F. Molten globule state of protein molecules in heat-induced transparent food gels // F. Tani, M. Murata, T. Higasa, et al. / *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1995. – Vol. 43. – P. 2325 – 2331.
287. Tomlinson J.H. Dimerization of protein g b1 domain at low ph: A conformational switch caused by loss of a single hydrogen bond // J.H. Tomlinson, C.J. Craven, M.P. Williamson, M.J. Pandya / *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 78. – P. 1652 – 1661.
288. Cordier F. Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution nmr // F. Cordier, S. Grzesiek / *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 317. – P. 739 – 752.
289. Durchschlag H. Modeling the hydration of proteins at different ph values / In *Analytical Ultracentrifugation VII* / Eds. M.D. Lechner, L. Börger. – Springer. – 2004. – Vol. 127. – P. 98 – 112.
290. Zhang Y. Observation of high-temperature dynamic crossover in protein hydration water and its relation to reversible denaturation of lysozyme // Y. Zhang,

- M. Lagi, D. Liu, et al. / The Journal of Chemical Physics. – 2009. – Vol. 130. – 135101.
291. Fändrich M. Structural polymorphism of alzheimer A β and other amyloid fibrils // M. Fändrich, J. Meinhardt, N. Grigorieff / Prion. – 2009. – Vol. 3. – P. 89 – 93.
292. Verel R. Polymorphism in an amyloid-like fibril-forming model peptide // R. Verel, I.T. Tomka, C. Bertozzi, et al. / Angewandte Chemie International Edition. – 2008. – Vol. 47. – P. 5842 – 5845.
293. Petkova A.T. Solid state nmr reveals a ph-dependent antiparallel β -sheet registry in fibrils formed by a β -amyloid peptide // A.T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, et al. / Journal of Molecular Biology. – 2004. – Vol. 335. – P. 247 – 260.
294. Chamberlain A.K. Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy // A.K. Chamberlain, C.E. MacPhee, J. Zurdo, et al. / Biophysical Journal. – 2000. – Vol. 79. – P. 3282 – 3293.
295. Nilsberth C. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A[beta] protofibril formation // C. Nilsberth, A. Westlind-Danielsson, C.B. Eckman, et al. / Nature Neuroscience. – 2001. – Vol. 4. – P. 887 – 893.
296. Murakami K. Neurotoxicity and physicochemical properties of A β mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: Implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease // K. Murakami, K. Irie, A. Morimoto, et al. / Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – P. 46179 – 46187.
297. Chothia C. Conformation of twisted β -pleated sheets in proteins // C. Chothia / Journal of Molecular Biology. – 1973. – Vol. 75. – P. 295 – 302.
298. Richardson J.S. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation // J.S. Richardson, D.C. Richardson / Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – Vol. 99. – P. 2754 – 2759.
299. Wolfe L.S. Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye Thioflavin T // L.S. Wolfe, M.F. Calabrese, A. Nath, et al. / PNAS. – 2010. – Vol. 107. – P. 16863 - 16868.

300. Knowles T.P.J. Analysis of structural order in amyloid fibrils // T.P.J. Knowles, J.F. Smith, G.L. Delvin, et al. / Nanotechnology. – 2007. – Vol. 18. –044031.
301. Reis L.V. The synthesis and characterization of novel, aza-substituted squarylium cyanine dyes // L.V. Reis, J.P. Serrano, P. Almeida, P.F. Santos / Dyes and Pigments. – 2009. – Vol. 81. – P. 197 – 202.
302. Mustroph H. Current developments in optical data storage with organic dyes // H. Mustroph, M. Stollenwerk, V. Bressau / Angewandte Chemie International Edition. – 2006. – Vol. 45. – P. 2016 – 2035.
303. Awasthi K. Modification of near-infrared cyanine dyes by serum albumin protein // K. Awasthi, G. Nishimura / Photochemical & Photobiological Sciences. – 2011. – Vol. 10. – P. 461 – 463.
304. Prabhakar C. Third order nonlinear optical properties of squaraine dyes having absorption below 500 nm: A combined experimental and theoretical investigation of closed shell oxyallyl derivatives // C. Prabhakar, K. Bhanuprakash, V.J. Rao, et al. / The Journal of Physical Chemistry C. – 2010. – Vol. 114. – P. 6077 – 6089.
305. Reichardt C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators // C. Reichardt / Chemical Reviews. – 1994. – Vol. 94. – P. 2319 – 2358.
306. Jose R.-L. Squaraines as reporter units: Insights into their photophysics, protonation, and metal-ion coordination behaviour // R.-L. Jose, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, J. Soto, M. Spieles, K. Rurack / Chemistry – A European Journal. – 2008–Vol. 14. – P. 10101 – 10104.
307. Welder F. Symmetric and asymmetric squarylium dyes as noncovalent protein labels: A study by fluorimetry and capillary electrophoresis // F. Welder, B. Paul, H. Nakazumi, et al. / Journal of Chromatography B. – 2003. – Vol. 793. – P. 93 – 105.
308. Shammass S.L. Perturbation of the stability of amyloid fibrils through alteration of electrostatic interactions // S.L. Shammass, T.P. Knowles, A.J. Baldwin, et al. / Biophysical Journal. – 2011. – Vol. 100. – P. 2783 – 2791.
309. Tatikolov A.S. Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: A spectroscopic study // A.S. Tatikolov, S. M.B. Costa / Biophysical Chemistry. – 2004. – Vol. 107. – P. 33 – 49.

310. Gayathri D.D. Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine: A novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer models in vivo // D.D. Gayathri, T.R. Cibir, D. Ramaiah, A. Abraham / Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2008. – Vol. 92. – P. 153 – 159.
311. Cano M.L. Squaraines inside zeolites: Preparation, stability, and photophysical properties // M.L. Cano, F.L. Cozens, M.A. Esteves, et al. / The Journal of Organic Chemistry. – 1997. – Vol. 62. – P. 7121 – 7127.
312. Nepraš M. Structure and properties of fluorescent reactive dyes: Electronic structure and spectra of some benzanthrone derivatives // M. Nepraš, O. Machalický, M. Šeps, et al. / Dyes and Pigments. – 1997. – Vol. 35. – P. 31 – 44.
313. Rettig W. Charge separation in excited states of decoupled systems—tict compounds and implications regarding the development of new laser dyes and the primary process of vision and photosynthesis // W. Rettig / Angewandte Chemie International Edition in English. – 1986. – Vol. 25. – P. 971 – 988.
314. Rettig W. On twisted intramolecular charge transfer (TICT) states in N-aryl carbazoles // W. Rettig, M. Zander / Chemical Physics Letters. – 1982. – Vol. 87. – P. 229 – 234.
315. Grabowski Z.R. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: Focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures // Z.R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig / Chemical Reviews. – 2003. – Vol. 103. – P. 3899 – 4032.
316. Chattopadhyay A. Exploring membrane organization and dynamics by the wavelength-selective fluorescence approach // A. Chattopadhyay / Chemistry and Physics of Lipids. – 2003. – Vol. 122. – P. 3 – 17.
317. Demchenko A.P. On the nanosecond mobility in proteins // A.P. Demchenko / Biophysical Chemistry. – 1982. – Vol. 15. – P. 101 – 109.
318. Garrison M.D. Fluorescence spectroscopy of 9-anthroyloxy fatty acids in solvents // M.D. Garrison, L.M. Doh, R.O. Potts, W. Abraham / Chemical Physics Lipids. – 1994. – Vol. 70. – P. 155 – 162.

319. Haldar S. Monitoring orientation and dynamics of membrane-bound melittin utilizing dansyl fluorescence // S. Haldar, H. Raghuraman, A. Chattopadhyay / *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – P. 14075 – 14082.
320. Mukherjee S. Motionally restricted tryptophan environments at the peptide-lipid interface of gramicidin channels // S. Mukherjee, A. Chattopadhyay / *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – P. 5089 – 5097.
321. Pierce D.W. Stark effect spectroscopy of tryptophan // D.W. Pierce, S.G. Boxer / *Biophysical Journal*. – 1995. – Vol. 68. – P. 1583 – 1591.
322. Nizamov S.N. Influence of molecular structure of squaraine dyes on their aggregation in aqueous solutions // S.N. Nizamov, M.N. Barakaeva, E.N. Kurtaliev, et al. / *Journal of Applied Spectroscopy*. – 2009. – Vol. 76. – P. 464 – 469.
323. Nelson R. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils // R. Nelson, M.R. Sawaya, M. Balbirnie, et al. / *Nature*. – 2005. – Vol. 435. – P. 773 – 778.
324. Zheng J. Modeling the Alzheimer A β 17-42 fibril architecture: Tight intermolecular sheet-sheet association and intramolecular hydrated cavities // J. Zheng, H. Jang, B. Ma, et al. / *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 93. – P. 3046 – 3057.
325. Grabchev I. The synthesis and application of fluorescent dyes based on 3-amino benzanthrone // I. Grabchev, V. Bojinov, I. Moneva / *Dyes and Pigments*. – 2001. – Vol. 48. – P. 143 – 150.
326. Dobretsov G.E. Quantification of fluorescent molecules in heterogeneous media by use of the fluorescence decay amplitude analysis // G.E. Dobretsov, T.I. Syrejshchikova, Y.A. Gryzunov, M.N. Yakimenko / *Journal of Fluorescence*. – 1998. – Vol. 8. – P. 27 – 34.
327. Sarkar N. Twisted charge transfer processes of nile red in homogeneous solutions and in faujasite zeolite // N. Sarkar, K. Das, D.N. Nath, K. Bhattacharyya / *Langmuir*. – 1994. – Vol. 10. – P. 326 – 329.
328. Togashi D. Time-resolved fluorescence studies on bovine serum albumin denaturation process // D. Togashi, A. Ryder / *Journal of Fluorescence*. – 2006. – Vol. 16. – P. 153 – 160.

329. Schütz A.K. The amyloid–congo red interface at atomic resolution // A.K. Schütz, A. Soragni, S. Hornemann, et al. / *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – Vol. 50. – P. 5956 – 5960.
330. Joy T. ApoA1 related amyloidosis: A case report and literature review // T. Joy, J. Wang, A. Hahn, R.A. Hegele / *Clinical Biochemistry*. – 2003. – Vol. 36. – P. 641 – 645.
331. Lee J.-H. Real-time analysis of amyloid fibril formation of α -synuclein using a fibrillation-state-specific fluorescent probe of jc-1 // J.-H. Lee, I.-H. Lee, Y.-J. Choe, et al. / *Biochemical Journal*. – 2009. – Vol. 418. – P. 311 – 323.
332. Margittai M. Fibrils with parallel in-register structure constitute a major class of amyloid fibrils: Molecular insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy // M. Margittai, R. Langen / *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2008. – Vol. 41. – P. 265 – 297.
333. Кантор Ч. Биофизическая химия. Том 1. / Ч.Кантор П.Ш. Перевод с английского. Под редакцией А.А.Богданова, Ю.С.Лазуркина, М.Д.Франк-Каменецкого. – Москва: «Мир», 1984. – 336 с.
334. Ran C. Non-conjugated small molecule fret for differentiating monomers from higher molecular weight amyloid beta species // C. Ran, W. Zhao, R.D. Moir, A. Moore / *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – e19362.
335. Tokunaga Y. Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils // Y. Tokunaga, Y. Sakakibara, Y. Kamada, et al. / *International Journal of Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 9. – P. 219 – 227.
336. Kurouski D. Disulfide bridges remain intact while native insulin converts into amyloid fibrils // D. Kurouski, J. Washington, M. Ozbil, et al. / *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – e36989.
337. Matthews B.W. Hydrophobic interactions in proteins / B.W. Matthews. – In *Encyclopedia of Life Sciences: John Wiley & Sons, Ltd*, 2001. – p. 1 – 6.
338. Ulijn R.V. Designing peptide based nanomaterials // R.V. Ulijn, A.M. Smith / *Chemical Society Reviews*. – 2008. – Vol. 37. – P. 664 – 675.

339. Haidekker M.A. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes // M.A. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, E.A. Theodorakis / *Bioorganic Chemistry*. – 2005. – Vol. 33. – P. 415 – 425.
340. Красовицкий Б. Органические люминофоры / Б. Красовицкий. - Ленинград: Химия, 1984. – 336 с.
341. Grabtchev I.K. Functional properties of azomethine substituted benzanthrone dyes for use in nematic liquid crystals // I.K. Grabtchev, V.B. Bojinov, I.T. Moneva / *Journal of Molecular Structure*. – 1998. – Vol. 471. – P. 19 – 25.
342. Hawe A. Fluorescent molecular rotors as dyes to characterize polysorbate-containing igg formulations // A. Hawe, V. Filipe, W. Jiskoot / *Pharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 27. – P. 314 – 326.
343. Velsko S.P. Solvent influence on photochemical isomerizations: Photophysics of dodci // S.P. Velsko, G.R. Fleming / *Chemical Physics*. – 1982. – Vol. 65. – P. 59 – 70.
344. Åkesson E. Isomerization dynamics in solution described by kramers' theory with a solvent-dependent activation energy // E. Åkesson, V. Sundström, T. Gillbro / *Chemical Physics*. – 1986. – Vol. 106. – P. 269 – 280.
345. Stegemeyer H. Photoluminescence of solutions // H. Stegemeyer / *Angewandte Chemie*. – 1969. – Vol. 81. – P. 1007 – 1008.
346. Meadows F. Determination of protein–dye association by near infrared fluorescence-detected circular dichroism // F. Meadows, N. Narayanan, G. Patonay / *Talanta*. – 2000. – Vol. 50. – P. 1149 – 1155.
347. Ioffe V. A new fluorescent squaraine probe for the measurement of membrane polarity // V. Ioffe, G. Gorbenko, Y. Domanov, et al. / *Journal of Fluorescence*. – 2006. – Vol. 16. – P. 47 – 52.
348. Mathis C.A. Synthesis and evaluation of 11c-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents // C.A. Mathis, Y. Wang, D.P. Holt, et al. / *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2003. – Vol. 46. – P. 2740 – 2754.

349. Грызунов Ю.А. Альбумин сыворотки в клинической медицине // Ю.А. Грызунов, Г.Е. Добрецов / Ириус. – 1994. – 226 с.
350. Kirilova E. Novel benzanthrone dyes: Synthesis and comparison of luminescent properties // E. Kirilova, I. Ivanova / Material Science & Applied Chemistry. – 2011. – Vol. 23. – P. 29 – 33.
351. Staneva D. Synthesis and functional properties of new optical pH sensor based on benzo[de]anthracen-7-one immobilized on the viscose // D. Staneva, R. Betcheva / Dyes and Pigments. – 2007. – Vol. 74. – P. 148 – 153.
352. Grabchev I. Fluorescent 3-oxy benzanthrone dyes in liquid crystalline media // I. Grabchev, I. Moneva, E. Wolarz, D. Bauman / Dyes and Pigments. – 2003. – Vol. 58. – P. 1 – 6.
353. Kapusta P. Photophysics of 3-substituted benzanthrone: Substituent and solvent control of intersystem crossing // P. Kapusta, O. Machalický, R. Hrdina, et al. / The Journal of Physical Chemistry A. – 2003. – Vol. 107. – P. 9740 – 9746.
354. Hattori A. Towards single-molecule detection of intramolecular exciplexes: Photophysics of a benzanthrone derivative // A. Hattori, H. Sato, M. Vacha / Journal of Luminescence. – 2007. – Vol. 122–123. – P. 256 – 258.
355. Lu B. Electrochemical polymerization of benzanthrone and characterization of its excellent green-light-emitting polymer // B. Lu, J. Xu, C. Fan, et al. / The Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – Vol. 113. – P. 37 – 48.
356. Swaminathan R. Lysozyme: A model protein for amyloid research // R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, et al. / Advances in protein chemistry and structural biology. – 2011. – Vol. 84. – P. 63 – 111.
357. Le Tilly V. pH dependence of hydrogen bond strengths in myoglobin α -helices // V. Le Tilly, O. Sire, P.T.T. Wong, B. Alpert / Chemical Physics Letters. – 1992. – Vol. 192. – P. 62 – 64.
358. Alizadeh-Pasdar N. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes // N. Alizadeh-Pasdar, E.C.Y. Li-Chan / Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2000. – Vol. 48. – P. 328 – 334.

359. Sabaté R. On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2 // R. Sabaté, I. Lascu, S.J. Saupe / *Journal of Structural Biology*. – 2008. – Vol. 162. – P. 387 – 396.
360. Urbic T. Ions increase strength of hydrogen bond in water // T. Urbic / *Chemical Physics Letters*. – 2014. – Vol. 610–611. – P. 159 – 162.
361. Goto Y. Conformational states in Beta-lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt // Y. Goto, A.L. Fink / *Biochemistry*. – 1989. – Vol. 28. – P. 945 – 952.
362. Kamata N. Comparison of pH and ionic strength dependence of interactions between monoclonal antibodies and bovine β -lactoglobulin // N. Kamata, A. Enomoto, S. Ishida, et al. / *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1996. – Vol. 60. – P. 25 – 29.
363. Melander W. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series // W. Melander, C. Horváth / *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1977. – Vol. 183. – P. 200 – 215.
364. Oh H.I. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes // H.I. Oh, J.E. Hoff, G.S. Armstrong, L.A. Haff / *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1980. – Vol. 28. – P. 394 – 398.
365. Kadima W. The influence of ionic strength and pH on the aggregation properties of zinc-free insulin studied by static and dynamic laser light scattering // W. Kadima, L. Øgden, R. Bauer, et al. / *Biopolymers*. – 1993. – Vol. 33. – P. 1643 – 1657.
366. Reddington M.V. Synthesis and properties of phosphonic acid containing cyanine and squaraine dyes for use as fluorescent labels // M.V. Reddington / *Bioconjugate Chemistry*. – 2007. – Vol. 18. – P. 2178 – 2190.
367. Isgor Y.G. Chemosensing in deep red: A squaraine-based fluorescent chemosensor for pH // Y.G. Isgor, E.U. Akkaya / *Tetrahedron Letters*. – 1997. – Vol. 38. – P. 7417 – 7420.
368. Yesudas K. Origin of near-infrared absorption and large second hyperpolarizability in oxyallyl diradicaloids: A three-state model approach // K.

Yesudas, K. Bhanuprakash / The Journal of Physical Chemistry A. – 2007. – Vol. 111. – P. 1943 – 1952.

369. Karelson M. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies // M. Karelson, V.S. Lobanov, A.R. Katritzky / Chemical Reviews. – 1996. – Vol. 96. – P. 1027-1044.

370. Tetko I. Virtual computational chemistry laboratory – design and description // I. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, et al. / J. Comput. Aided Mol. Des. – 2005. – Vol. 19. – P. 453 – 463.

371. Андрюков К. В. Оценка полуэмпирических методов расчёта структуры N-арил-замещенных производных антраниловой кислоты для прогнозирования коэффициента распределения октанол – вода // К.В. Андрюков, Л.М. Коркодинова, Ю.Л. Данилов, М.И. Вахрин / Современные проблемы науки и образования. – 2012. – Т. 3. – С. 1 – 5.

372. Inshyn D.I. Development of a quantitative structure activity relations (QSAR) model to guide the design of fluorescent dyes for detecting amyloid fibrils // D.I. Inshyn, V.B. Kovalska, M.Y. Losytsky, et al. / Biotechnic & Histochemistry. – 2014. – Vol. 89. – P. 1 – 7.

373. Chen X. QSAR and primary docking studies of trans-stilbene (tsb) series of imaging agents for β -amyloid plaques // X. Chen / Journal of Molecular Structure THEOCHEM. – 2006. – Vol. 763. – P. 83 – 89.

374. Крищицин А.П. In silico підходи для раціонального дизайну потенційних протиракових агентів з групи поліциклічних тіопірано[2,3-d]тіазолів // А.П. Крищицин, І.В. Драпак, Б.С. Зіменковський, В.В. Огурцов, Р.Б. Лесик / http://194.44.211.179:8282/cgi-bin/irbis64r_12/cgiirbis_64.exe?LN.

375. Volkova K.D. Novel fluorescent trimethine cyanine dye 7519 for amyloid fibril inhibition assay // K.D. Volkovaa, V.B. Kovalska, D. Inshin, Y.L. Slominskii, O.I. Tolmachev, S.M. Yarmoluk / Biotechnic & Histochemistry. – 2011. – Vol. 86. – P. 188 – 191.

376. Kee H.L. Structural control of the photodynamics of boron-dipyrin complexes // H.L. Kee, C. Kirmaier, L. Yu, et al. / Journal of Physical Chemical Biology. – 2005. – Vol. 109. – P. 20433 – 20443.
377. Xing L. Novel methods for the prediction of logP, pKa, and logD // L. Xing, R.C. Glen / Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 2002. – Vol. 42. – P. 796 – 805.
378. Castaing M. Membrane permeation by multidrug-resistance-modulators and non-modulators: Effects of hydrophobicity and electric charge // M. Castaing, P. Brouant, A. Loiseau, et al. / Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2000. – Vol. 52. – P. 289 – 296.
379. Srinivas K. Enhanced diradical nature in oxyallyl derivatives leads to near infrared absorption: A comparative study of the squaraine and croconate dyes using computational techniques† // K. Srinivas, C. Prabhakar, C.L. Devi, et al. / The Journal of Physical Chemistry A. – 2007. – Vol. 111. – P. 3378 – 3386.
380. Prabhakar C. Near-infrared absorption in symmetric squarylium and croconate dyes: A comparative study using symmetry-adapted cluster-configuration interaction methods // C. Prabhakar, K. Yesudas, G. Krishna Chaitanya, et al. / The Journal of Physical Chemistry A. – 2005. – Vol. 109. – P. 8604 – 8616.
381. Prabhakar C. Linear and nonlinear optical properties of mesoionic oxyallyl derivatives: Enhanced non-resonant third order optical nonlinearity in croconate dyes // C. Prabhakar, K. Yesudas, K. Bhanuprakash, et al. / The Journal of Physical Chemistry C. – 2008. – Vol. 112. – P. 13272 – 13280.
382. Puyad A.L. DFT studies of squarylium and core-substituted squarylium dye derivatives: Understanding the causes of the additional shorter wavelength absorption in the latter // A.L. Puyad, G. Krishna Chaitanya, A. Thomas, et al. / Journal of Physical Organic Chemistry. – 2013. – Vol. 26. – P. 37 – 46.
383. Law K.Y. Squaraine chemistry: Effects of structural changes on the absorption and multiple fluorescence emission of bis[4-(dimethylamino)phenyl]squaraine and its derivatives // K.Y. Law / The Journal of Physical Chemistry. – 1987. – Vol. 91. – P. 5184 – 5193.

384. Mayerhöffer U. Synthesis and molecular properties of acceptor-substituted squaraine dyes // U. Mayerhöffer, M. Gsänger, M. Stolte, et al. / Chemistry – A European Journal. – 2013. – Vol. 19. – P. 218 – 232.
385. Shaffer R.E. Multi- and megavariate data analysis. Principles and applications // R.E. Shaffer / Journal of Chemometrics. – 2002. – Vol. 16. – P. 261 – 262.
386. Wold S. PLS-regression: A basic tool of chemometrics // S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson / Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. – 2001. – Vol. 58. – P. 109 – 130.
387. Zhytniakivska O. Newly synthesized benzanthrone derivatives as prospective fluorescent membrane probes // O. Zhytniakivska, V. Trusova, G. Gorbenko, et al. / Journal of Luminescence. – 2014. – Vol. 146. – P. 307 – 313.
388. Trusova V. Novel benzanthrone aminoderivatives for membrane studies // Trusova V., E. Kirilova, I. Kalnina, et al. / Journal of Fluorescence. – 2012. – Vol. 22. – P. 953 – 959.
389. Abdi H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PSL regression) // H. Abdi / Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. – 2010. – Vol. 2. – P. 97 – 106.
390. Ritchie T.J. Physicochemical descriptors of aromatic character and their use in drug discovery // T.J. Ritchie, S.J.F. Macdonald / Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 57. – P. 7206 – 7215.
391. Porat Y. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism // Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit / Chemical Biology & Drug Design. – 2006. – Vol. 67. – P. 27 – 37.
392. Schütz A.K. The amyloid–Congo Red interface at atomic resolution // A.K. Schütz, A. Soragni, S. Hornemann, et al. / Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – Vol. 50. – P. 5956 – 5960.
393. Bich C. Probing the hydrophobic effect of noncovalent complexes by mass spectrometry // C. Bich, S. Baer, M.C. Jecklin, R. Zenobi / Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2010. – Vol. 21. – P. 286 – 289.

394. Frański R. Do hydrophobic interactions exist in the gas phase? // R. Frański, B. Gierczyk, G. Schroeder, et al. / *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2008. – Vol. 22. – P. 1339 – 1343.
395. Zhao L. 3D-QSAR and docking studies on 2-arylbenzoxazole and linker- γ transthyretin amyloidogenesis inhibitors // L. Zhao, L. Zhang, M. Lei / *Sci. China Chem.* – 2013. – Vol. 56. – P. 1550 – 1563.
396. Sun J. Docking and 3D-QSAR studies of influenza neuraminidase inhibitors using three-dimensional holographic vector of atomic interaction field analysis // J. Sun, S. Cai, N. Yan, H. Mei / *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 45. – P. 1008 – 1014.
397. Kundi V. New trans-stilbene derivatives with large two-photon absorption cross-section and non-linear optical susceptibility values – a theoretical investigation // V. Kundi, P.P. Thankachan / *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17. – P. 12299 – 12309.
398. Afantitis A. Ligand - based virtual screening procedure for the prediction and the identification of novel β -amyloid aggregation inhibitors using kohonen maps and counterpropagation artificial neural networks // A. Afantitis, G. Melagraki, P.A. Koutentis, et al. / *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 46. – P. 497 – 508.
399. Scalmani G. Geometries and properties of excited states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model // G. Scalmani, M.J. Frisch, B. Mennucci, et al. / *The Journal of Chemical Physics*. – 2006. – Vol. 124. – P. 94 – 107.
400. Sutharsan J. Molecular rotors: Synthesis and evaluation as viscosity sensors // J. Sutharsan, D. Lichlyter, N.E. Wright, et al. / *Tetrahedron*. – 2010. – Vol. 66. – P. 2582 – 2588.
401. Klymchenko A.S. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers // A.S. Klymchenko, G. Duportail, A.P. Demchenko, Y. Mély / *Biophys J.* – 2004. – Vol. 86. – P. 2929 – 2941.

402. Palyulin V.A. MFTA: Recent extensions of molecular field topology analysis // In EuroQSAR2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions / Blackwell Publishing. – 2003. – P. 188 – 190.
403. Hasegawa K. GA strategy for variable selection in qsar studies: GA-based pls analysis of calcium channel antagonists // K. Hasegawa, Y. Miyashita, K. Funatsu / Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 1997. – Vol. 37. – P. 306-310.
404. Höskuldsson A. PLS regression methods // A. Höskuldsson / Journal of Chemometrics. – 1988. – Vol. 2. – P. 211-228.

ДОДАТОК А

Статистичні характеристики теоретичних моделей, отриманих методом часткової регресії найменших квадратів

У ході аналізу методом часткової регресії найменших квадратів (PLSR) спочатку відсіюються ті квантово-хімічні дескриптори, що мають однакові значення майже для усіх компонентів (зондів) тренувального набору [402]. На другому етапі знаходять дескриптори, що мають максимальні значення параметру Q^2 (передбачувальна здатність) за допомогою генетичного алгоритму (цей підхід моделює еволюцію Дарвіна великої кількості так званих «хромосом», тобто однакових компактних презентацій можливих рішень проблеми оптимізації), або крос-валідації [403]. При крос-валідації розрахунки проводяться декілька разів так, що певна частина тренувального набору зондів не використовується у конструюванні моделі (тобто лінійного рівняння для прогнозування активності зондів). У подальшому, значення активності для виключеного набору зондів розраховують за допомогою цієї часткової моделі. Кожен зонд виключається з тестувального набору тільки один раз, і нормована загальна похибка прогнозування для них (Q^2) виступає мірою передбачувальної здатності моделі. PLSR дозволяє отримати лінійну модель (що відображає залежність експериментального параметра від групи квантово-хімічних дескрипторів) з найкращою передбачувальною здатністю (та оптимальною кількістю дескрипторів). Розрахунки здійснювали у програмному пакеті PLS (<http://www.vcclab.org/lab/pls/>) [404]):

$$Q_j^2 = \frac{s_y^2 - MSECV}{s_y^2} = \frac{s_y^2 - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - \bar{y}_i)^2}{s_y^2}, \quad (\text{A.1})$$

де s_y – середньоквадратичне відхилення розрахованих значень активності зондів тренувального набору j від їх експериментального середнього значення;

$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - \bar{y}_i)^2$ – дисперсія крос-валідації для виключених компонентів, \bar{y}_i – середнє значення активності зондів у виключеному наборі, f_i – теоретично розраховане значення активності i -го барвника за допомогою часткової моделі; N – число зондів у виключеному наборі [372]. Параметр Q^2 показує, наскільки дана модель краща, ніж та, що отримана за допомогою випадкового вибору (для моделей з доброю передбачувальною здатністю $Q^2 > 0.5$) [389]. Коефіцієнт Фішера FtY для певної моделі розраховували за формулою:

$$FtY = \frac{RY^2}{1 - RY^2} \cdot \frac{f_1}{f_2}, \quad (\text{A.2})$$

де «пояснена» дисперсія $f_1 = k$ (k – число параметрів моделі) вища за «непояснену» $f_2 = N - k - 1$ при рівні значущості 0.05.

Загальна середня абсолютна похибка моделі MYE :

$$MYE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |f_i - y_i|, \quad (\text{A.3})$$

де f_i та y_i – теоретичне та експериментальне значення активності i -го зонда усієї групи, відповідно; N – число зондів у групі.

Загальна стандартна абсолютна похибка залишків $SD2Y$:

$$SD2Y = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - y_i)^2} \quad (\text{A.4})$$

Середньоквадратичне відхилення крос-валідації RMS_{cv} :

$$RMS_{cv} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - \bar{y}_i)^2}, \quad (\text{A.5})$$

де \bar{y}_i – середнє значення активності зондів у виключеному наборі, f_i – теоретично розраховане значення активності за допомогою часткової моделі.

Вклад I_j дескрипторів групи чутливих до F_{acs} зондів до I/I_0 був розрахований як:

$$I_j = \frac{b_j \cdot range(x_j)}{range(y_j)}, \quad (A.6)$$

де b_j – коефіцієнт біля x_j -го дескриптору моделі, $range(x_j)$ та $range(y_j)$ – діапазони змін x_j та y_j (експериментального значення I/I_0) у тренувальному наборі).